

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Farmacología y Toxicología



TESIS DOCTORAL

**Neurogénesis hipocampal adulta: papel en el deterioro
cognitivo post-ictus y estrategias farmacológicas para su
modulación**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Juan de la Parra Gonzalo

Directores

M^a Ángeles Moro Sánchez
Ignacio Lizasoain Hernández
M^a Isabel Cuartero Desviat

Madrid, 2019

Neurogénesis hipocampal adulta: papel en el deterioro cognitivo post-ictus y estrategias farmacológicas para su modulación

Juan de la Parra Gonzalo

Directores: Dña. M^a Ángeles Moro Sánchez
D. Ignacio Lizasoain Hernández
Dña. M^a Isabel Cuartero Desviat

Doctorado en Biomedicina
Universidad Complutense de Madrid



Facultad de Medicina
Departamento de Farmacología y Toxicología

Madrid, 2018

Con la financiación del Ministerio de Economía, Industria y Competitividad



Dña. M^a Ángeles Moro Sánchez, doctora en Farmacia y Catedrática de Universidad adscrita al Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid,

D. Ignacio Lizasoain Hernández, doctor en Medicina y Cirugía y Catedrático de Universidad adscrito al Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid,

Dña. M^a Isabel Cuartero Desviat, doctora en Ciencias Biomédicas e Investigadora postdoctoral en el Departamento de Neuropatología Molecular del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa

CERTIFICAN:

1) Que la tesis doctoral titulada **“Neurogénesis hipocampal adulta: papel en el deterioro cognitivo post-ictus y estrategias farmacológicas para su modulación”** presentada por D. Juan de la Parra Gonzalo para optar al grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid ha sido realizada en las dependencias del Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid bajo su supervisión.

2) Que la presente tesis doctoral reúne todas las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor en Biomedicina por la Universidad Complutense de Madrid con Mención Internacional.

De acuerdo con la normativa vigente, y como directores de la mencionada tesis doctoral, firmamos el presente certificado por el que se autoriza su presentación.

En Madrid, a de de 2018

Dra. M^a Ángeles Moro

Dr. Ignacio Lizasoain

Dra. M^a Isabel Cuartero

MENCIÓN DE DOCTORADO INTERNACIONAL

La presente tesis doctoral reúne los requisitos exigidos por la Universidad Complutense de Madrid para obtener la mención de Doctor Internacional (R.D. 1393/2007):

1) Estancias predoctorales en centros de investigación internacional:

- Centro receptor: The Peter Gilgan Centre for Research and Learning, The Hospital for Sick Kids (Toronto, Canadá)
- Supervisor: Dr. Paul W. Frankland
- Duración de la estancia: 4 meses (Agosto-Diciembre 2017)

2) Evaluadores externos internacionales

3) Miembro externo internacional del tribunal evaluador de la tesis doctoral

A mis padres, mi tata

y Paloma

Y finalmente, aquí nos encontramos, próximo a cerrar un capítulo y con ilusión a abrir la puerta al siguiente. Dada la extensión del mismo, una breve pero cariñosa alusión a todos los que de un modo u otro han contribuido a este trabajo.

En primer lugar, mis padres. Un buen GRACIAS con mayúsculas. Bien sabéis y bien os lo repetimos lo afortunados que somos de teneros como padres. Porque os habéis desvivido por nosotros, nos habéis dado siempre todo lo mejor, nos habéis demostrado una confianza total en nuestros proyectos y sobre todo, me habéis dado y enseñado el valor de la familia por encima de todo. Gracias por soportar mi tozudez, mi firme cuadrícula mental y por seguir cuidándome.

A mi tata. Lo mucho que siempre me has y sigues cuidándome. No puedo estar más agradecido de tener una hermana que tanto me apoya, tanta ilusión le hacen todos mis movimientos y lo cerca que está siempre. Mi ejemplo de superación, tenacidad, bondad y alegría.

A mis más amigos cercanos. Arturo, mi medio hermano. Si no es por haber dejado actuar por medio de ti, hoy no sería quien soy. Gracias por ser ejemplo de amistad, trabajador incansable, curiosidad, excentricidad y acogedor. Blasco, mi otra media naranja, cuántos... ¿15 años? Gracias por ser cómo eres, por tu sinceridad, tu apoyo incondicional, excentricidad a la par, por abrirnos tu casa de par en par y tratarme con uno más de tu familia. David, no tantos años, pero muy intensos. Qué vuelco más grande de vida y espero y deseo que des mucha vida ya que, yo el primero, bien la necesitamos todos. AnaB, mi hermana postiza como quien dice. Gracias por preocuparte siempre de nosotros, por estar atenta. Te deseo lo mejor y sabes que aquí estamos. Igualmente, Pilar, Estefania, Marcos,

Esther, Dani, Juan, Pati y un largo etc...me siento muy afortunado de poder contar con todos vosotros.

A mi buen Fr. José Ignacio. Por medio de ti, me has ido dando a conocer lo más importante en la vida. Ejemplo de servicio, disposición, entrega, cariño y fidelidad. Gracias por enseñarme en quien fijarse y a qué aspirar. Gracias por acogerme y llevarme de la mano para colocarme en camino y poco a poco echar a andar.

A mi familia postiza, Paloma, Manuel, Blanca y Clara. Gracias por acogerme de la mejor manera posible en la familia. Por el cariño y curiosidad que siempre mostráis por mi cosas. Por la confianza en nosotros y por hacerme sentir en casa.

También quería aprovechar la oportunidad para agradecer a los profesores M^a Teresa Manteiga, Jesús M^a López, Isabel Corpas, Iñigo Azcoitia, Benjamín Fernández y Carmen Rúa. Cual esponja, no he podido disfrutar más en vuestras clases. Recuerdo con ilusión las miles de horas solucionando las inmensas matrices y ecuaciones con las que se modelizaba el comportamiento animal, las inacabables rutas de señalización y componentes celulares que finalmente daban lugar a la célula, la altísima diversidad y especialización tisular a lo largo de la filogenia, la perfecta sincronización entre los sistemas y, finalmente, la bella complejidad con la que las desconocidas estrellas bailando a la par en nuestra cabeza nos permiten adquirir el ser que somos y conocer dónde nos encontramos.

Y ahora cambiamos a la otra esfera.

Corría el cuarto curso de carrera cuando mi señora directora de tesis M^a Ángeles me abrió las puertas de su laboratorio. Tras una breve entrevista en su despacho, como un torbellino apareció por la puerta mi otro director, Nacho

Lizasoain. Y recuerdo ahora con mucha simpatía cómo aquel momento resume bien quienes son. Gracias a los dos por darme la oportunidad, con confianza ciega, de pasar estos años con vosotros. Del Juan del RAPI, ahora soy quien soy. Personalmente, puedo decir que me he sentido muy mimado científicamente. Nunca me he sentido limitado, siempre empujado a ir a más. Y aunque a veces las horas se nos quedan cortas, gracias por siempre estar disponibles, por ser ejemplo de pelea en esta ciencia que tantos quebraderos de toda índole tiene, por valorar y cuidar el plano personal de todos los que formamos el laboratorio, por confiar en nosotros y defendernos a espada, por continuamente motivarnos, por alegraros con nuestras alegrías y por darnos apoyo en los momentos bajos, por buscar siempre la excelencia en todo y en todos y cada uno de nosotros. Gracias!

Y tal cual acabo la entrevista, me bajaron a conocer a los miembros de aquella UIN. Oli, Rober, Tamara, Lupe, Victor, Macarena, David, Mayka, Isaac. ¡Gracias por acogerme tan bien y enseñarme un montón! Al poco llegó Sara, ¡ya una postdoctoral fellow! A por todas Sara. Y también, poco después, el ya UCM teacher Jesús, y la mejor Lab manager, Lidia. Gracias, chicos, por vuestro cariño. Sois geniales y me alegro que todo el esfuerzo se esté recompensando.

Y fueron llegando TFMs que luego se convertirían en actuales predocs algunos en la UIN otros en sus labos. De estos últimos, destacar a Diego Martilo. Gracias Diego por los meses que compartimos y por ser ejemplo de esfuerzo y apostar por lo que uno busca. Seguro que te va genial.

Y de los que se quedaron; Isa, compañera desde Biología. Sinceramente, me alegro mucho de ver cómo con tesón, y tras mucho esfuerzo, en breve te convertirás en toda una doctora. Desde el principio no ha sido nada fácil, pero

finalmente, conseguido, es para estar contenta y orgullosa. Ya no te queda nada! La psicóloga de la UIN Carolinska. Da gusto verte trabajar. Ejemplo de esfuerzo, autocrítica, superación y siempre dejándose sorprender. Gracias por todas las cosas psicometales que me enseñas! Violeta D, la terremoto. Otra que da gusto verla trabajar. Gracias por tu predisposición a siempre estar disponible para todos. Por cuidarnos en el departamento y por luchar por todos nosotros en las altas esferas! Por tus consejos hosteleros y seriófilos! Buen tándem hacéis las dos! Violeta M, la del país de al lado! Poco a poco, vaya tesis te estás montando. Infinitas gracias por tus consejos queseros y cachoperos!

A mi buen compañero de batalla y hermano en la ciencia Alberto. Con pocas personas me he cruzado que muestre tanta disponibilidad y servicialidad, no solo con los suyos sino con todos. Por ser tan desinteresado. Me da mucha alegría ver como estás despegando y consiguiendo que todo ese esfuerzo se plasme y nos hagas disfrutar con ello. Gracias por siempre echarme no una mano, sino los dos brazos en todo. Te deseo lo mejor.

Agradecer a todos los miembros del departamento de Farmacología y Toxicología, en especial a todos los predocs: Cristina, Silvia, María, Sergio, Raquel, Pablo, Marta, Gema, Nuria, Paloma, Alonso, Aline, David. Y a los recién postdocs: Dani, David y Marcos. Gracias por siempre tener tiempo para ayudar y echarnos unas risas. A los técnicos del departamento Fernando, Alberto y Manolo. Sin olvidar a M^a Luisa por los medios de cultivo que me preparaba. A todo el personal del CAI de Resonancia, ahora también miembros de la UIN. David, Marién, Palmira y JuanMA. Gracias por vuestras ideas y predisposición a cogernos los ratones hasta el último minuto! Al personal del Animalario del CIB; en especial a Tomás, Manuel y Paco. Da gusto cómo os preocupáis por nuestros experimentos.

No quiero olvidar igualmente la ayuda del Dr. Sánchez-Prieto y Dr. Ricardo Martín por su ayuda en los experimentos de electrofisiología presentes en este trabajo.

I really wanted to thank Dr. Paul W. Frankland to open his lab to me at Sickkids Hospital in Toronto. I have never thought it finally came true. Thank you so much for make me feel like one more in the lab. Thanks for spending time explaining me high memory and learning concepts and to give me the chance to participate in lovely projects. My lab partner Axel Guskjolen, thanks man! You are great. It was awesome to be part of your thesis project, I enjoyed so much. Thanks for those canadian's beers and for all your confidence. Thanks Jagroop Dhaliwal for all those funny momments and helping us with the optogenetics and retro experiments. I enjoyed a lot with you both, you are great people. I wish you both the best.

Y bueno, los siguientes con una mención especial.

Ana! Mil gracias por como eres. MNP! Curranta nata, en todo te metes, incansable, siempre de buen humor. Por sacarnos a altas horas de la UIN para disfrutar de esas cervezas y esos nachos! Por todas las confianzas. Valoro un montón tu sinceridad, eso demuestra cariño y que los demás te importamos de verdad. Te mereces un montón triunfar en todos los aspectos. Y se te echa mucho de menos por aquí.

Dr. Balleteros! Puedo decir una de las personas más inteligentes que conozco. He disfrutado y aprendido muchísimo contigo el tiempo que estuvimos trabajando mano a mano. Recuerdo los western, qPCRs, cultivos, y las cirugías viendo el fútbol a la vez...qué grande! Esas sesiones de running con el posterior

pilates! Me alegro un montón todo lo que has conseguido con gran esfuerzo y sacrificio. Siempre nos quedará el Gambrinus.

La tita Ali! La otra MNP. Mil gracias preciosidad porque como a veces hablamos, parece mentira que siendo tan diferentes seamos tan íntimos. Me alegro un montón por todo lo que te está pasando porque te lo mereces. Gracias por poder contar contigo en todo momento y por tu confianza.

Mari, mi otra directora de esta tesis! Gracias por todo lo que me has enseñado. A nivel de ciencia, creo de verdad que no puedo haber tenido a mejor postdoc. Gracias por tu paciencia para explicarme todo con detalle. Contigo todo es fácil, pero además ilusionante. No he encontrado a nadie que le ponga tanta ilusión y tanta fuerza a esto cuando las cosas se tambalean. Gracias por valorar siempre mi opinión y mis ideas. Pero sobre todo, poner de relieve la gran persona que hay delante de esa mochila. Ejemplo de responsabilidad, empatía y desvivirse para con los suyos. Que la rumba no pare! Ole, ole y olé.

Y finalmente gracias a Paloma. Mi mitad. Quien me da la alegría de vivir cada día. Por el proyecto tan ilusionante que empezamos hace años. Por tu apoyo día y noche y tu confianza incondicional en mí. Por buscar siempre mi felicidad. Por ser quien mejor me entiende y en los momentos duros me hace levantar la cabeza y mirar para arriba. Porque contigo es mejor. Juntos.

AMDG

Verso l'Alto

INDICE

RESUMEN	25
1.1 RESUMEN PARTE I	27
1.2 RESUMEN PARTE II	31
ABSTRACT	35
1.3 ABSTRACT PART I	37
1.4 ABSTRACT PART II	41
INTRODUCCIÓN PARTE I	45
2.1 ENFERMEDAD CEREBROVASCULAR	47
2.2 CLASIFICACION DEL ICTUS	49
2.3 ICTUS ISQUÉMICO: DETERIORO COGNITIVO VASCULAR POST-ICTUS	51
2.4 NEUROGÉNESIS EN EL HIPOCAMPO ADULTO	61
INTRODUCCIÓN PARTE II	81
2.5 EL RECEPTOR PARA HIDROCARBUROS AROMÁTICOS (AHR)	83
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	99
3.1 HIPÓTESIS	101
3.2 OBJETIVOS BLOQUE 1	102
3.3 OBJETIVOS BLOQUE 2	104
MATERIALES Y MÉTODOS	107
4.1 TÉCNICAS EXPERIMENTALES <i>IN VIVO</i>	109
RESULTADOS PARTE I	151
5.1 EFECTO DE LA INHIBICION DE LA RESPUESTA NEUROGENICA HIPOCAMPAL EN EL DETERIORO COGNITIVO TRAS ISQUEMIA CEREBRAL EXPERIMENTAL	153
RESULTADOS PARTE II	195
5.2 PAPEL DEL RECEPTOR DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS (AHR) EN LA MORFOLOGÍA DE LAS NUEVAS NEURONAS GRANULARES Y LA MEMORIA DEPENDIENTE DEL HIPOCAMPO	197
DISCUSION PARTE I	225
6.1 EFECTO DE LA INHIBICION DE LA RESPUESTA NEUROGENICA HIPOCAMPAL EN EL DETERIORO COGNITIVO TRAS ISQUEMIA CEREBRAL EXPERIMENTAL	227
DISCUSION PARTE II	249
6.2 PAPEL DEL RECEPTOR DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS (AHR) EN LA MORFOLOGÍA DE LAS NUEVAS NEURONAS GRANULARES Y LA MEMORIA DEPENDIENTE DEL HIPOCAMPO	251
CONCLUSIONES	265
ANEXOS	271
BIBLIOGRAFIA	275

ABREVIATURAS

ACC: Arteria carótida común

ACM: Arteria cerebral media

ACSF: Líquido cefalorraquídeo artificial

ADN: Ácido desoxinucléico

AE: Alternancia espontánea

AhR: Receptor de hidrocarburos aromáticos

AIP1: Proteína 1 de interacción con la actina

AIT: Ataque isquémico transitorio

AMPA: α -amino-3-hidroxil-5metil-4-isoxazol-propionato

ARNT: Translocador nuclear del receptor de arilos

ATD: Fragmento A de la toxina de la difteria

BDNF: Factor neurotrófico derivado de cerebro

BHE: Barrera hematoencefálica

bHLH: básico Hélice-bucle-Hélice

BMAL: Receptor nuclear translocador de aril hidrocarburos en cerebro y músculo

BrdU: Bromodesoxiuridina

CA: *Cornu ammonis*

CE: Corteza entorrinal

CEP: Corriente excitatoria postsináptica

CMC: Condicionamiento al miedo contextual

DALY: *Disability-adjusted life year*

DCV: Deterioro cognitivo vascular

DCX: Doublecortina (*Doublecortin*)

DRE: Elemento de respuesta a dioxina

EA: Enfermedad de Alzheimer

ECV: Enfermedad cerebrovascular

ERT2: Receptor de estrógenos tipo 2

FT: Factor de transcripción

GABA: Ácido γ -aminobutírico

GD: Giro dentado

GFAP: Proteína ácida fibrilar glial

GFP: Proteína fluorescente verde

HAH: *Halogenated aromatic hydrocarbon*

HIF-1 α : Factor inducido por hipoxia 1 α

HSP90: Proteína de choque térmico 90

INE: Instituto Nacional de Estadística

MEM: Memantina

MMP: Metaloproteinasa de matriz

NeuN: Núcleo neuronal

NGF: Factor de crecimiento neuronal

NLO: Nueva localización del objeto

NMDA: N-metil-D-aspartato

NSC: *Neural stem cell*

OCSP: *Oxford community stroke project*

OMS: Organización Mundial de la Salud

PAH: *Polyaromatic aromatic hydrocarbon*

PCB: Bifenilos policlorinados

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

pMCAO: Oclusión permanente de la arteria cerebral media

PPR: Relación de pares de pulsos

PSA-NCAM: *Polysialylated-neural cell adhesion molecule*

RMN: Resonancia magnética nuclear

RON: Reconocimiento del objeto nuevo

TCDD: 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina

TLR: Receptor tipo Toll

TMZ: Temozolomida

TNF α : Factor de necrosis tumoral α

TP: Tracto perforante

TPL: Tracto perforante lateral

TPM: Tracto perforante medial

TTX: Tetrodotoxina

XAP2: Proteína asociada a X tipo 2

XRE: Elemento de respuesta a xenobióticos

ZSG: Zona subgranular

ZSV: Zona subventricular

1

RESUMEN

1.1 RESUMEN PARTE I

NEUROGENESIS HIPOCAMPAL ADULTA: PAPEL EN EL DETERIORO COGNITIVO POST-ICTUS Y ESTRATEGIAS FARMACOLÓGICAS PARA SU MODULACIÓN.

En los países occidentales, el ictus sigue considerándose como una de las patologías más devastadoras en términos tanto económicos como sociosanitarios. Mientras que la mayoría de los tratamientos se han enfocado en estudiar y promover la recuperación de la función motora, apenas se conocen los mecanismos por los cuales el ictus da lugar a pérdidas de la función cognitiva a largo plazo. Para entender la fisiopatología de estos déficits, decidimos explorar las alteraciones cognitivas que se producen en un modelo experimental de

isquemia cerebral mediante la oclusión permanente de la arteria cerebral media (pMCAO).

Con este modelo experimental, pusimos de manifiesto que la isquemia cerebral produce un deterioro cognitivo a largo plazo en las memorias dependientes de hipocampo, tanto de tipo contextual como espacial, y que estos déficits se debían a una alteración en el patrón específico de activación neuronal en la formación hipocampal.

Como se ha comentado, los déficits cognitivos que hemos encontrado son dependientes del hipocampo, una de las principales estructuras cerebrales implicadas en procesos de memoria y aprendizaje. En nuestro modelo experimental, a pesar que el daño tisular que se produce es exclusivamente a nivel cortical, la isquemia cerebral, produce un engrosamiento de la capa granular del giro dentado hipocampal que se correlaciona con un mayor deterioro cognitivo. Puesto que dicha región es conocida por ser una de las regiones neurogénicas principales en el cerebro de mamíferos adultos, estudiamos si la neurogénesis estaba participando en este proceso. Mediante un estudio temporal demostramos que, en efecto, el ictus potencia una respuesta neurogénica hipocampal bilateral sostenida durante al menos un mes, que da lugar a nuevas neuronas integradas en los circuitos hipocampales. Sorprendentemente, la respuesta neurogénica paralela al mayor volumen de la capa granular, se correlacionó con un mayor déficit de memoria.

A continuación, corroboramos la contribución de la respuesta neurogénica inducida por el ictus como principal responsable en el desarrollo de las alteraciones cognitivas, ya que, la potenciación de la neurogénesis hipocampal tras ictus

mediante ejercicio físico voluntario o mediante la administración de memantina, empeoró las pérdidas de memoria.

La incorporación de nuevas neuronas en los circuitos hipocampales a través de la neurogénesis hipocampal adulta se ha visto directamente relacionada con la regulación de los procesos de memoria y aprendizaje. Dado el “lugar físico” que ocupan las memorias, la incorporación de nuevas neuronas y, por tanto, la reorganización sináptica que se produce en los circuitos hipocampales llevan a la debilitación de las mismas, dando lugar al proceso conocido como “olvido” (*forgetting*). Pero además, en nuestro estudio demostramos la presencia de alteraciones morfológicas diferenciales en las nuevas neuronas generadas en el hipocampo como respuesta a la isquemia. Estos cambios morfológicos sugieren que las nuevas neuronas generadas tras la isquemia conducen a una remodelación patológica diferencial en los circuitos hipocampales donde las memorias se encuentran almacenadas.

Finalmente, hemos demostrado que la inhibición de la respuesta neurogénica en nuestro modelo experimental, tanto mediante la administración de temozolomida como por estrategia génica, es suficiente para disminuir el desarrollo del deterioro cognitivo. El resultado de esta inhibición impediría la integración de las nuevas neuronas que, en el contexto del ictus, da lugar al establecimiento de conexiones aberrantes que alteran los circuitos de la memoria, evitando así la alteración de la función cognitiva dependiente de hipocampo que se produce tras este daño cerebral.

1.2 RESUMEN PARTE II

NEUROGENESIS HIPOCAMPAL ADULTA: PAPEL EN EL DETERIORO COGNITIVO POST-ICTUS Y ESTRATEGIAS FARMACOLÓGICAS PARA SU MODULACIÓN.

La neurogénesis hipocampal adulta es un proceso que se encuentra altamente regulado tanto por factores extrínsecos como intrínsecos. Entre estos últimos, destacan los denominados factores de transcripción *básico Hélice-Bucle-Hélice* (*basic Helix-Loop-Helix*, bHLH). A esta familia de proteínas pertenece el receptor de hidrocarburos aromáticos (AhR). Aunque las principales funciones asociadas a este receptor se relacionan con los efectos tóxicos y carcinogénicos de los compuestos xenobióticos, cada vez son más los estudios que sugieren el papel de AhR en funciones fisiológicas. De hecho, dada la

expresión de AhR en el giro dentado del hipocampo junto con diversas evidencias que sugieren su participación en la regulación morfológica neuronal, decidimos explorar la función de AhR como regulador de la neurogénesis y la función hipocampal.

Primero, mediante la pérdida de función de AhR, demostramos que dicho receptor es fundamental para el correcto establecimiento de los diferentes tipos de memorias dependientes de hipocampo, como son las memorias de tipo episódica y espacial.

Asimismo, en nuestro estudio demostramos que AhR participa en la regulación de la generación de nuevas neuronas granulares en el hipocampo, ya que la ausencia del receptor produce una potenciación de las diferentes fases de la neurogénesis hipocampal adulta de manera edad-dependiente.

Las alteraciones de la función cognitiva observadas en ausencia de AhR y su coincidencia con los máximos niveles de neurogénesis indicaron la contribución de este receptor a otro nivel. La estructura de AhR se encuentra altamente conservada a lo largo de la filogenia desde organismos tan sencillos como *D. melanogaster* y pasando por *C. elegans* hasta los mamíferos. En estos invertebrados, la principal función atribuida a AhR es la regulación morfológica de diferentes tipos neuronales, papel que se está empezando a explorar en los mamíferos como función ancestralmente conservada a lo largo de la evolución. En nuestro trabajo, hemos demostrado que AhR participa no solo en el crecimiento del árbol dendrítico y las espinas dendríticas, y en su maduración, sino también en las propiedades electrofisiológicas de las nuevas neuronas generadas durante la

neurogénesis hipocampal adulta, regulando de este modo el establecimiento de las sinapsis en los circuitos hipocampales.

Por último, hemos demostrado que la ausencia específica de AhR en los progenitores neuronales del hipocampo es suficiente para potenciar tanto la neurogénesis hipocampal adulta y los cambios morfológicos en las nuevas neuronas generadas, como las alteraciones de diferentes tipos de memorias dependientes de hipocampo. Por tanto, el receptor AhR se posiciona como un potente regulador de la neurogénesis y función hipocampal hasta ahora prácticamente desconocido.

1

ABSTRACT

1.3 ABSTRACT PART I

THE ROLE OF ADULT HIPPOCAMPAL NEUROGENESIS: IN POST-STROKE COGNITIVE IMPAIRMENT AND PHARMACOLOGICAL STRATEGIES FOR ITS MODULATION.

Ischemic stroke is considered one of the most devastating pathologies in both economic and sanitary terms in western countries. Most of the therapies and studies have been focused on the recovery of locomotor impairments. However the mechanisms underlying cognitive deficits after ischemic stroke are still unknown so far. To understand the physiopathology of those mechanisms, we decided to explore the cognitive deficits produced by the permanent occlusion of the middle cerebral artery (pMCAO) in mice.

First, in our experimental model we have demonstrated that ischemic stroke produces an hippocampal-dependent long term cognitive decline, specifically

regarding contextual and spatial memories. Those deficits were not due to a hippocampal activation inhibition, but to a specific neuronal activation pattern alteration throughout the hippocampus.

As previously mentioned, memories affected were dependent on hippocampus, one of the main brain structures involved in learning and memory. Even though the damage caused is limited to the somatosensory cortex, our model also produces an increased granular cell layer volume in the hippocampal dentate gyrus, which correlates with the cognitive decline. Given that this structure is one of the main neurogenic regions in the adult mammal brain, we reasoned that neurogenesis could be involved in this process. By performing a longitudinal study, we demonstrate that stroke produces a bilateral hippocampal neurogenesis burst lasting at least one month that promotes the generation of new fully mature and integrated neurons in the hippocampal circuits. This neurogenesis burst that is parallel to the increased granular cell volume observed, strikingly correlated with the memory loss. Since neurogenesis enhancement by physical activity or memantine treatment worsened the cognitive deficits, our data suggest that stroke-induced neurogenesis is a major contributor to post-stroke cognitive decline.

The integration of newborn neurons after neurogenesis in the hippocampal circuits has been shown to modulate learning and memory processes. Due to the fact that memories are embedded in a specific physical substrate, the circuitry remodeling produced by the integration of newborn neurons seems to weaken previous acquired memories, a phenomenon known as “forgetting” that could explain the cognitive deficits observed. Furthermore, in our study, we also demonstrate a differential neuronal morphology of the newborn neurons at each hippocampus side. Those morphological alterations suggest that newborn neurons

generated after stroke lead to a pathological hippocampal remodeling where memories are stored promoting the forgetting effect.

Finally, we demonstrate in our model that the inhibition of stroke-induced neurogenesis, by temozolomide treatment or by genetic ablation is enough to block the development of post-stroke cognitive decline. This inhibition would prevent the final integration of newborn neurons leading to an aberrant connectivity disrupting memory circuits in the stroke setting, thus avoiding cognitive impairment after this brain injury.

1.4 ABSTRACT PART II

THE ROLE OF ADULT HIPPOCAMPAL NEUROGENESIS: IN POST-STROKE COGNITIVE IMPAIRMENT AND PHARMACOLOGICAL STRATEGIES FOR ITS MODULATION.

Adult hippocampal neurogenesis is a highly regulated process by both extrinsic and intrinsic factors. Regarding intrinsic factors, the basic-Helix-Loop-Helix (bHLH) transcription factors play a key role in this process. The aryl hydrocarbon receptor (AhR) belongs to this family of proteins. Even though AhR is traditionally known for its participation in the toxic and carcinogenic effects of the xenobiotic compounds, its physiological functions are still being understood. Actually, given its expression in hippocampal dentate gyrus and considering that

different evidences suggest its role in neuronal morphology, we decided to study AhR as a regulator of neurogenesis and hippocampal function.

First, using loss-of-function approaches, we have demonstrated that this receptor plays a key role in the establishment of the different types of hippocampus-dependent memories.

Hippocampal neurogenesis has been demonstrated to regulate both learning and memory processes. In our study we have also demonstrated that AhR regulates the generation of newborn neurons in the hippocampus, where AhR loss-of-function enhances all the different stages of adult hippocampal neurogenesis in an age-dependent manner.

Cognitive function impairments observed in the absence of AhR together with high neurogenesis levels seems to indicate the contribution of this receptor to the memory deficits at other level. AhR molecular structure is highly conserved across species from *D. melanogaster* and the worm *C. elegans* to mammals. In those invertebrates, the main function of AhR is the regulation of the morphology regulation of different kinds of neurons, a role that is beginning to be explored in mammals as an ancestral conserved function across the evolution. In our study, we demonstrate that AhR regulates dendrite arborization and dendritic spine density in newborn neurons and its maturation but also their electrophysiological properties. Specifically, AhR modulates the establishment of correct synapses of the newborn neurons in the hippocampal circuits.

Finally, we have demonstrated that the specific deletion of AhR in the hippocampal neural progenitors cells is enough to enhance adult hippocampal neurogenesis and the morphological changes in the new generated neurons as

well as the different hippocampal-dependent memory impairments. Hence, our data first show that AhR might be considered as a powerful neurogenic and hippocampus-dependent function tool.

2

INTRODUCCIÓN PARTE I

2.1 ENFERMEDAD CEREBROVASCULAR

Se define como **enfermedad cerebrovascular (ECV)** la alteración de la función cerebral que aparece como consecuencia de un trastorno circulatorio, bien de los vasos cerebrales, o por alteraciones hemáticas.

Entre las ECVs de tipo agudo se encuentran tanto alteraciones transitorias (AIT, ataque isquémico transitorio) como permanentes (ictus, que engloba, a su vez, el infarto cerebral, la hemorragia parenquimatosa o ventricular, la hemorragia subaracnoidea y la trombosis de senos venosos cerebrales). También se incluyen la demencia vascular, la encefalopatía hipóxico-isquémica (isquemia cerebral global) y los síndromes de encefalopatía posterior reversible asociados a vasoespasmo, entre otros (Lizasoain I, Moro MA, Vivancos J. 2018. Farmacología de la enfermedad de Alzheimer y de la enfermedad cerebrovascular. Fármacos

psicoestimulantes y nootropos. En Velázquez. Farmacología Básica y Clínica (pp. 311). Madrid. Panamericana).

En cuanto a las ECVs permanentes, la Organización Mundial de la Salud (OMS) define el **ictus** como “el rápido desarrollo de signos focales o globales de compromiso de la función cerebral, con síntomas de 24 horas o más que lleven a la muerte sin otra causa que el origen vascular” (1989). La gravedad del episodio varía desde la discapacidad grave y la muerte hasta la recuperación parcial o casi completa del paciente.

El ictus representa una de las principales causas de muerte a nivel mundial, con un fuerte impacto social y económico para los sistemas sanitarios (OMS). En los países occidentales, el ictus es la **segunda-tercera causa más frecuente de muerte** (representando un 11% de las defunciones) viéndose solo superada por el infarto agudo de miocardio (Lozano et al., 2012). En España, según el Instituto Nacional de Estadística (INE), en el año 2015 el ictus se situó como la primera y segunda causa de muerte en mujeres y hombres, respectivamente, solo por detrás de las enfermedades cardíacas.

Por otro lado, el ictus es considerado como la **principal causa de discapacidad** de origen neurológico y la **segunda causa de demencia** después de la enfermedad de Alzheimer (EA). Mientras que el 45% de los pacientes que sobreviven al ictus consiguen una recuperación completa, el 55% restante manifiestan distintos grados de discapacidad (Francescutti et al., 2005). En este contexto, el número de DALYs (*Disability Adjusted Life Years*; años perdidos por discapacidad) debido al ictus a nivel mundial es de aproximadamente 47 millones, representando alrededor del 3% de los DALYs totales (Johnston et al., 2009). Todo

ello supone no solo un alto coste a nivel personal y familiar, sino también un fuerte impacto socioeconómico, estimándose aproximadamente un 3-4% del gasto sanitario a escala mundial (Alvarez Sabín et al., 2006), con cifras que alcanzan los 800 millones de euros a nivel europeo (Olesen et al., 2012) y 65 mil millones de dólares en los Estados Unidos (Rosamond et al., 2008).

Dado el progresivo aumento de la esperanza de vida en el mundo occidental, se prevé un incremento de la prevalencia del ictus en los años venideros. Además, se estima en un rango del 6-28% la prevalencia de los infartos cerebrales silentes. Estas cifras son preocupantes si se considera que el infarto cerebral silente se ha relacionado tanto con el riesgo de un primer episodio de ictus clínico como con el deterioro cognitivo.

2.2 CLASIFICACION DEL ICTUS

La clasificación del ictus se lleva a cabo según su temporalidad, etiología y/o sintomatología. Entre las clasificaciones más reconocidas destacan la realizada por el *National Institute of Neurological Disorders and Stroke* (NINDS) (1990), la clasificación del ensayo multicéntrico TOAST (*Trial of ORG 10172 in Acute Stroke Treatment*) (1993) (Adams et al., 1993), la clasificación OCSP (*Oxfordshire Community Stroke Project*) (1983) y la clasificación A.S.C.O (*Atherosclerosis-small vessel disease-cardiac source-other*) (Amarenco et al., 2009).

Tomando como referencia la clasificación propuesta por el NINDS, atendiendo a diferentes aspectos etiológicos, patogénicos y sintomáticos, el ictus se divide en: **ictus de tipo isquémico** y **de tipo hemorrágico (Figura 1)** (Chen et al., 2012; Díez-Tejedor et al., 2001).

El **ictus de tipo isquémico** se debe a una reducción ya sea parcial o total del flujo sanguíneo en regiones cerebrales concretas produciéndose una interrupción del aporte de oxígeno y glucosa como consecuencia de la obstrucción de un vaso por embolia o trombosis. El tamaño de la lesión dependerá tanto del calibre del vaso ocluido como de la densidad de la circulación colateral. Dependiendo de la duración del ictus isquémico, se distingue entre, **ataque isquémico transitorio (AIT)** o **infarto cerebral establecido** (ictus isquémico propiamente dicho). Mientras que en el caso del AIT, la duración es inferior a 24 horas y tiene carácter reversible (Díez-Tejedor et al., 2001), la oclusión de un vaso durante más de 24 horas en el caso del infarto cerebral establecido conlleva la necrosis del tejido afectado acompañado de déficits neurológicos.

Por último, el ictus isquémico se puede clasificar en **aterotrombótico**, **cardioembólico** y **lacunar**. Cuando el infarto es debido a otras causas menos frecuentes es clasificado como **infarto de causa inhabitual**. En aquellas situaciones en las que no se puede categorizar en ninguna de las anteriores se clasifica como **infarto de origen indeterminado**.

Por otro lado, el **ictus de tipo hemorrágico** es producido como consecuencia de la ruptura de un vaso sanguíneo cerebral, lo que conlleva la liberación de sangre ya sea al parénquima cerebral o ventrículos cerebrales (hemorragia cerebral) o al compartimento subaracnoideo (hemorragia subaracnoidea). El ictus de tipo isquémico es el más frecuente, representando el 80% del total de las ECVs frente al 15% de las hemorragias cerebrales y el 5% de las subaracnoideas (Amarenco et al., 2009).

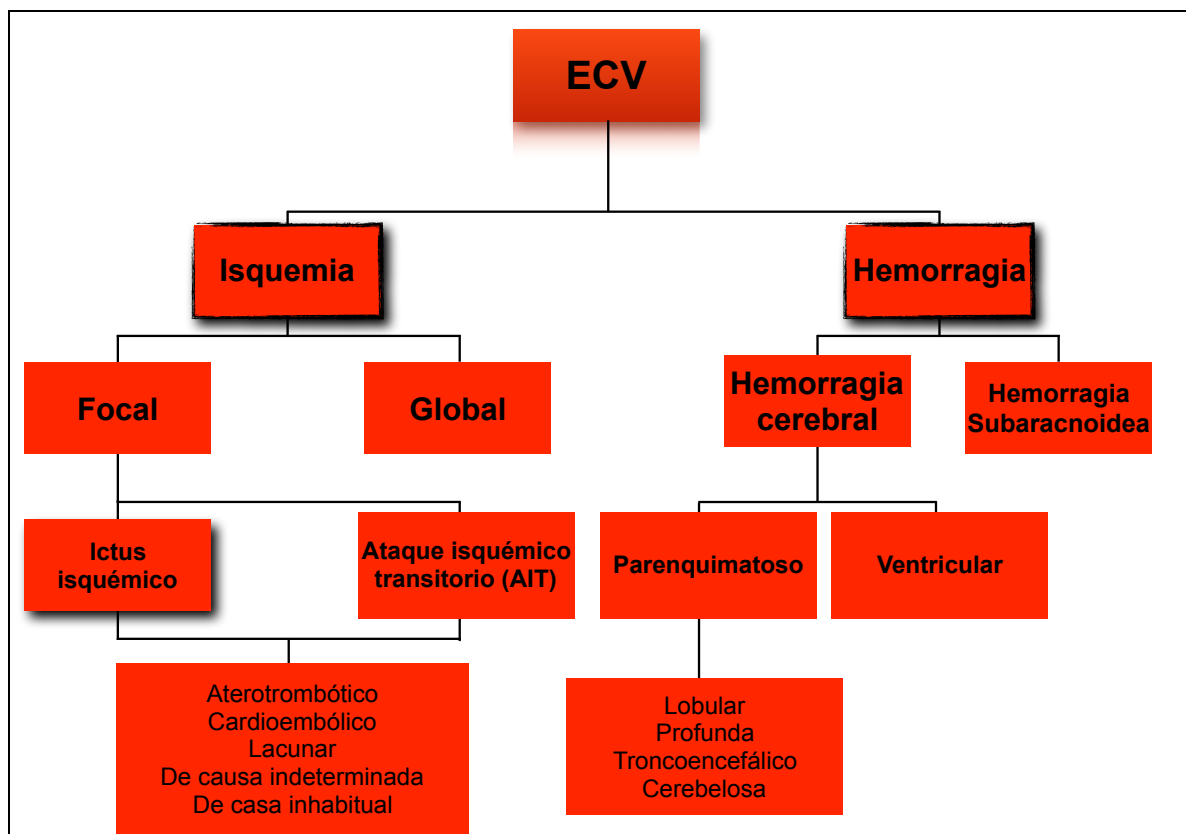


Figura 1. Clasificación de la enfermedad cerebrovascular (Chen et al., 2012; Donnan et al., 2008; Diéz-Tejedor et al., 2001).

2.3 ICTUS ISQUÉMICO: DETERIORO COGNITIVO VASCULAR POST-ICTUS

Las diferentes manifestaciones clínicas que presentan los pacientes de ictus dependen de diversos factores entre los que destacan la extensión y región cerebral lesionada, la temporalidad y la intervención terapéutica (ladecola, 2013).

Un alto porcentaje de pacientes que han sufrido un ictus desarrollan de manera prácticamente inmediata déficits de tipo motor. La alta prevalencia de los trastornos motores suele deberse a la propensión del ictus a dañar las regiones corticales y/o las proyecciones subcorticales que se encargan de controlar y coordinar el movimiento. Las principales manifestaciones motoras que se producen

son: debilidad, disminución de la activación muscular y alteraciones en la co-activación muscular, entre otra serie de anormalidades que, en conjunto, limitan la capacidad de movimiento junto con la coordinación motora espacio-temporal (Jones, 2017). Sin embargo, como resultado de los diferentes mecanismos neurorreparadores que se ponen en marcha durante la fase crónica del ictus, tales como la formación de nuevos vasos o el crecimiento de los existentes, o fenómenos de plasticidad neuronal junto con una apropiada terapia de rehabilitación, una gran mayoría de los pacientes es capaz de recuperar parte de estos déficits motores.

Pero además de dichos déficits motores, se estima que en uno de cada tres pacientes que han sobrevivido a un episodio isquémico desarrollan a largo plazo una afectación de los dominios cognitivos implicados en la atención, función ejecutiva, lenguaje, orientación y memoria, lo que da lugar a un progresivo déficit cognitivo que, por su etiología, se engloba en lo que se conoce como **deterioro cognitivo de origen vascular (DCV)**, siendo la **demencia vascular** su forma más grave.

2.3.1 Deterioro cognitivo vascular

La demencia se define como la **pérdida progresiva de la capacidad cognitiva**. Dado el progresivo envejecimiento poblacional que se está produciendo en los países occidentales como consecuencia del incremento de la esperanza de vida y la reducción de la natalidad, la demencia es considerada actualmente como la principal amenaza a nivel sanitario del siglo XXI a la que se tiene que enfrentar la población mundial (OMS, 2012). Cada año se identifican 7,7 millones de casos nuevos de demencia. La OMS calcula que actualmente 35,6 millones de personas

sufren demencia, cifra que se estima que se triplique para el año 2050 (OMS, 2012). Aunque algunos estudios muestran un ligero descenso en su prevalencia (Matthews et al., 2013), la demencia sigue suponiendo unos altos costes no solo a nivel social sino a nivel sanitario, superando actualmente en Estados Unidos el gasto en cáncer y enfermedades cardíacas (Hurd et al., 2013; Wimo et al., 2017). Por esta razón, durante los últimos años se está promoviendo el desarrollo de planes estratégicos con el objetivo de frenar la demencia y controlar sus efectos devastadores (*National Alzheimer's Project Act; Public Law 111-375*).

En particular, existe un grupo heterogéneo de trastornos cerebrales en donde el deterioro cognitivo se atribuye a patologías de origen cerebrovascular. Estos trastornos se engloban bajo el término de **deterioro cognitivo vascular (DCV)** y son responsables de al menos el 20% de los casos de demencia, solo por detrás de la EA (**Figura 2**) (Gorelick et al., 2011). Diferentes estudios clínicos no solo han identificado el papel del ictus como una de los principales desencadenantes del DCV, sino también como coadyuvante en la aparición y desarrollo de otros tipos de demencia como la propia EA (Gorelick et al., 2011; Toledo et al., 2013). Por tanto, es fundamental la identificación y caracterización de los procesos neuropatológicos que se desencadenan tras el ictus isquémico con el objetivo de limitar el desarrollo y progresión de la demencia vascular.

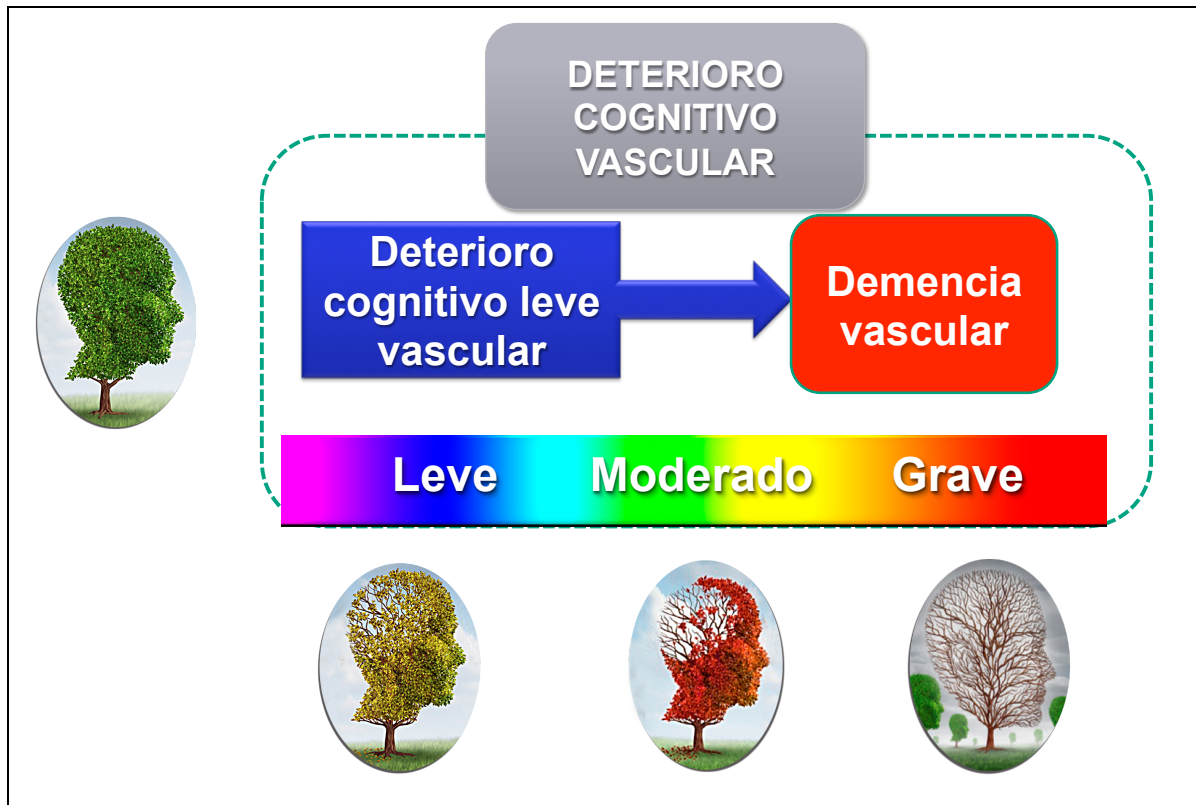


Figura 2. Representación esquemática de la progresión del deterioro cognitivo vascular.

2.3.2 Deterioro cognitivo vascular post-ictus

La identificación del ictus como uno de los posibles desencadenantes de las demencias ha ido evolucionando en las últimas décadas. En los años 70, se sugirió por primera vez que la demencia podría producirse en algunos casos como consecuencia de lesiones vasculares isquémicas múltiples (demencia multi-infarto) en pacientes hipertensos (Tomlinson et al., 1970). El hecho de proponer el ictus isquémico como posible desencadenante de las demencias puso de manifiesto la posibilidad de prevenir el desarrollo de las mismas en base al control del ictus (Hachinski et al., 1974). Más tarde, en los años 90, los criterios de diagnóstico que se empleaban para las demencias consistían principalmente en los que se utilizaban para la EA, que hacen hincapié en el deterioro cognitivo, la

irreversibilidad de los déficits y la incapacidad para desarrollar de manera normal las actividades cotidianas (Gorelick and Roman, 1993). Sin embargo, no tenían en consideración los déficits cognitivos asociados a las lesiones de origen cerebrovascular como son la función ejecutiva y las alteraciones motoras. Por lo tanto, se acuñó el término **deterioro cognitivo vascular (DCV)** para englobar el amplio espectro de **alteraciones cognitivas de origen vascular** (Hachinski and Bowler, 1993). De este modo, como se comentó anteriormente, una oportunidad para la prevención de las demencias la proporcionaba la identificación prematura de los factores de riesgo vasculares.

Actualmente, con el término DCV se hace referencia a **“un síndrome con evidencia clínica de ictus isquémico o de daño cerebral subclínico que se manifiesta con un deterioro cognitivo que afecta al menos uno de los dominios cognitivos”** (Gorelick et al., 2011).

2.3.3 Mecanismos fisiopatológicos y neuroreparadores en el deterioro cognitivo vascular post-ictus

A fecha de hoy está aún por definir la fisiopatología del DCV. Los síntomas clínicos de cada paciente varían dependiendo del origen y tipo de deterioro cognitivo vascular, así como del tamaño, gravedad y localización del área cerebral dañada **(Tabla1)**.

Dominio cognitivo	Descripción	Localización cerebral
Atención	<ul style="list-style-type: none"> • Vigilancia y orientación • Requerido para la mayoría de las funciones cognitivas 	<ul style="list-style-type: none"> • Corteza prefrontal, tálamo y sistema reticular
Lenguaje	<ul style="list-style-type: none"> • Verbalización, fluidez verbal, comprensión, etc 	<ul style="list-style-type: none"> • Corteza fronto-temporal
Función ejecutiva	<ul style="list-style-type: none"> • Planificación • Razonamiento abstracto, resolución de problemas 	<ul style="list-style-type: none"> • Corteza prefrontal • Participación de las zonas de la vision, lenguaje y memoria a corto plazo
Memoria	<ul style="list-style-type: none"> • Corto plazo: aprendizaje y recuperación de información (segundos-minutos) • Memoria de trabajo: almacenamiento transitorio y manipulación de la información • Largo plazo: almacenamiento de la información. 	<ul style="list-style-type: none"> • Lóbulo frontal, corteza prefrontal dorsolateral • Corteza prefrontal dorsolateral y ventrolateral • Hipocampo y sistema límbico
Visuo-espacial	<ul style="list-style-type: none"> • Comprensión y manipulación no verbal de información gráfica o geográfica 	<ul style="list-style-type: none"> • Corteza visual y lóbulo parietal
Praxis	<ul style="list-style-type: none"> • Ejecución de movimientos de manera inconsciente 	<ul style="list-style-type: none"> • Lóbulo parietal inferior • Lóbulo frontal (corteza premotora)
Función psicomotora	<ul style="list-style-type: none"> • Rapidez al ejecutar movimientos y en el procesamiento mental 	<ul style="list-style-type: none"> • Estructuras subcorticales (ganglios basales, tálamo, puente del cerebro)
Afectiva	<ul style="list-style-type: none"> • Cambios en el humor, depression y apatía 	<ul style="list-style-type: none"> • Corteza prefrontal, ganglios basales y sistema límbico.

Tabla1. Principales dominios cognitivos afectados en el DCV (Iadecola, 2013).

En los últimos años se han identificado una serie de procesos que son comunes en el daño cerebral asociado al DCV. Entre ellos destacan la hipoperfusión crónica, eventos tromboembólicos, enfermedades de pequeño vaso, microsangrados y hemorragias cerebrales (Figura 3). Aun así, dado que del DCV se deriva una gran variedad de patologías vasculares, resulta difícil establecer los

mecanismos fisiopatológicos comunes implicados en el desarrollo del déficit cognitivo. El resultado de estos procesos conlleva un estado de hipoxia crónica, una reducción del volumen circulante del líquido cefalorraquídeo (LCR), estrés oxidativo y una activación de la respuesta inflamatoria.

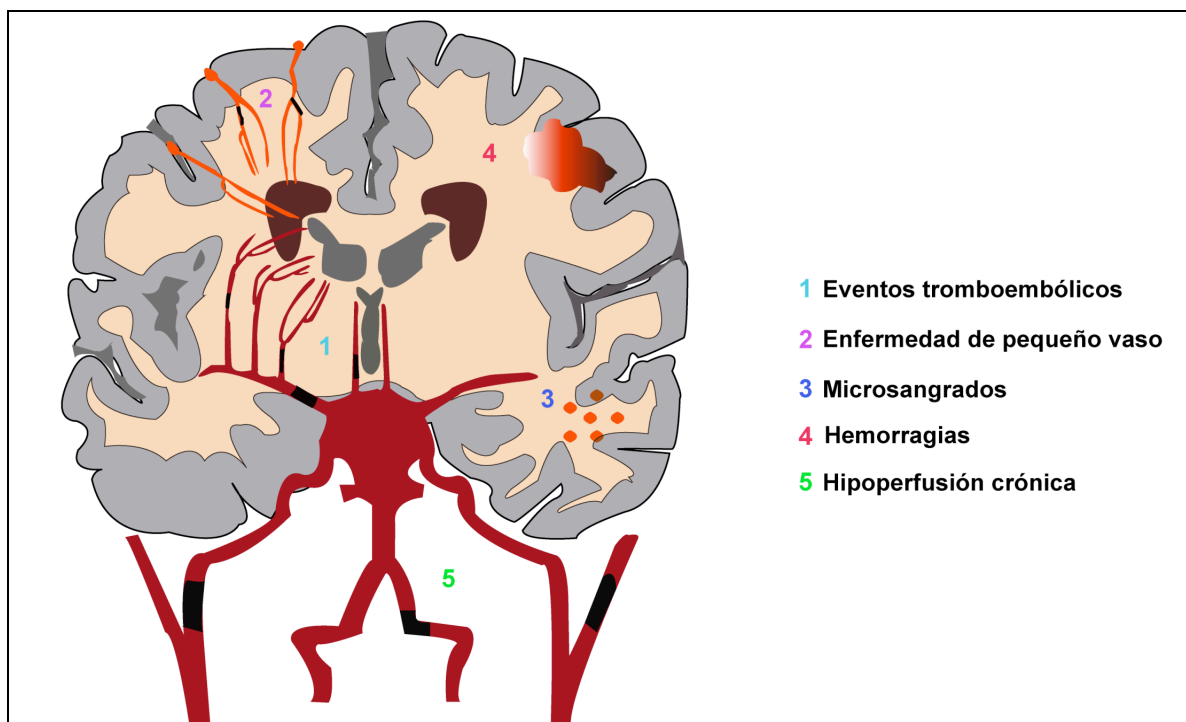


Figura 3. Principales procesos fisiopatológicos de origen vascular desencadenantes del deterioro cognitivo vascular.

En este contexto, diferentes estructuras cerebrales como los ganglios basales o **el hipocampo son especialmente susceptibles a estas alteraciones**. Tanto la hipoxia como el estrés oxidativo inducen disfunción mitocondrial, daño y apoptosis neuronal vía óxido nítrico y la producción de especies reactivas de oxígeno y radicales libres (Huang et al., 2007; Ma et al., 2013; Ritz et al., 2012). Este ambiente oxidante produce un daño en las células endoteliales, la glía y las neuronas, produciendo el desacoplamiento de las unidades neurovasculares y potenciando así la reducción del líquido cefalorraquídeo y el estado hipóxico (Liu

and Zhang, 2012). Por otro lado, factores proinflamatorios como las metaloproteinasas de matriz (MMP), las interleucinas, el factor de necrosis tumoral alfa ($\text{TNF}\alpha$), los receptores tipo Toll (TLRs) y la proteína C reactiva (PCR) producirán un aumento de la permeabilidad y la rotura de la barrera hematoencefálica (BHE) facilitando el reclutamiento y la infiltración de células proinflamatorias circulantes al parénquima cerebral, exacerbando el daño a la sustancia blanca (desmielinización, pérdida axonal y degeneración de oligodendrocitos) y potenciando la muerte neuronal y la activación microglial. Así mismo, la microglia activada secretará diversos factores que contribuirán al daño de la sustancia blanca y a la pérdida axonal. El daño y la pérdida de la sustancia blanca es uno de los rasgos característicos de la demencia vascular (**Figura 4**). La desmielinización progresiva conlleva un progresivo retraso en la neurotransmisión y por lo tanto una pérdida de la función cognitiva.

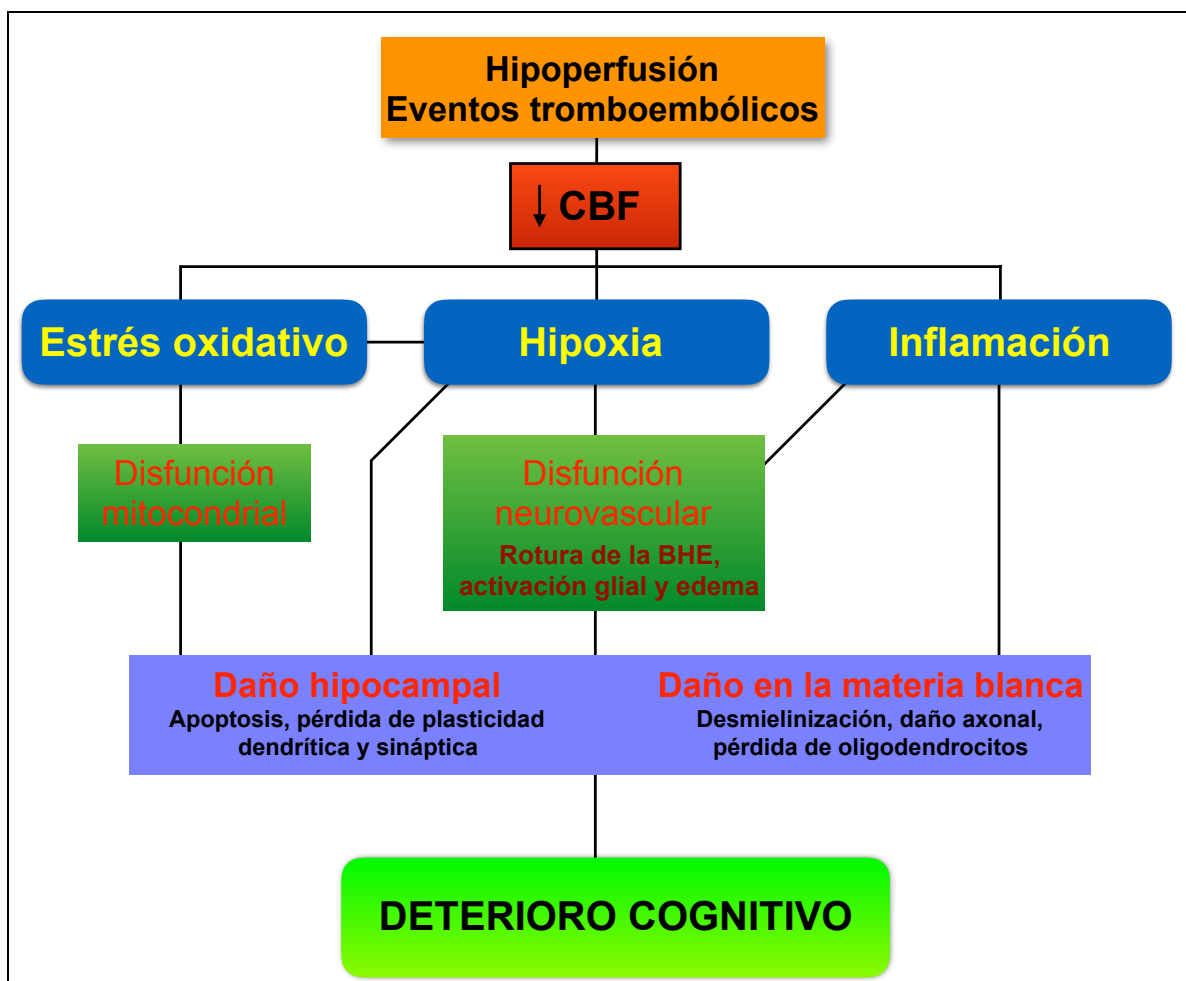


Figura 4. Principales mecanismos fisiopatológicos en el deterioro cognitivo vascular (Adaptado de Venkat et al., 2015).

Aunque no hay tratamiento establecido para el DCV más allá de los hábitos saludables y los fármacos dirigidos a contrarrestar los factores de riesgo de la enfermedad (antihipertensivos, antihipercolesterolémicos, antiagregantes y anticoagulantes antidiabéticos) o las comorbilidades que la acompaña (antidepresivos), mediante el estudio de los diferentes procesos y mecanismos moleculares que se ponen en marcha a lo largo del desarrollo del DCV, se han conseguido proponer diferentes terapias e identificar potenciales dianas terapéuticas sobre las que poder actuar. En principio, los inhibidores de acetilcolinesterasa utilizados en la EA no están indicados específicamente para el

DCV si bien hay varios ensayos clínicos en marcha que apuntan a su eficacia en esta enfermedad, especialmente en el caso de *memantina*, *rivastagmina* y *donepecilo*. Así, estos fármacos han conseguido mejorar tanto la función cognitiva como el comportamiento y las actividades diarias de los pacientes (Cramer et al., 2011; Zhou et al., 2016). En relación con la neurotransmisión colinérgica, la *citicolina* posee también potencial en los déficits cognitivos. Otra molécula relacionada con este sistema es el *alfoscerato de colina* (gliatilina: alfa-GPC), que en algunos ensayos muestra mejoras en las alteraciones de memoria y atención en el DCV y EA. Además, algunos estudios muestran efectos positivos de ciertos fármacos, muchos de ellos considerados nootropos. Así, el inhibidor de la fosfodiesterasa 3, *cilostazol*, del que además de sus acciones antiagregantes, se postula que aumenta la memoria y la plasticidad sináptica regulando a la alta factores de transcripción como CREB (*cAMP-pathway response element binding protein*: proteína de unión a elementos de respuesta a AMPc); el calcio-antagonista *nimodipino*, que muestra ciertas evidencias de beneficio a corto plazo; la *cerebrolisina*, una preparación peptídica obtenida de proteínas de cerebro de cerdo; o la *actovegina*, un extracto de sangre de ternera no autorizado en España. También se utilizan varios fármacos clasificados como vasodilatadores periféricos, de eficacia no bien establecida, como *piracetam*, para el que la evidencia sugiere el interés de estudios adicionales, *vinpocetina* y su precursor *vincamina* (alcaloide de la *Vinca minor*), los ergóticos *dihidroergocristina*, *nicergolina* y *dihidroergotoxina* (la comercialización de este último se ha suspendido en España), *naftidrofurilo*, el calcio-antagonista y anti-histamínico *cinarizina* y el antiagregante *pentoxifilina* (Lizasoain I, Moro MA, Vivancos J. 2018. Farmacología de la enfermedad de

Alzheimer y de la enfermedad cerebrovascular. Fármacos psicoestimulantes y nootropos. En *Velázquez*. Farmacología Básica y Clínica. Madrid. Panamericana).

Tal como se comentaba anteriormente, el hipocampo es una de las principales regiones cerebrales afectadas por el DCV. Dado el relevante papel que esta estructura desempeña en los procesos de memoria y aprendizaje, resulta fundamental comprender las alteraciones hipocampales que se producen en el contexto del DCV para identificar nuevas dianas terapéuticas en esta patología. En este sentido, dada la capacidad generadora de nuevas neuronas incluso durante la fase adulta, la posibilidad de actuar sobre los mecanismos reguladores de la neurogénesis hipocampal es una de las dianas que se están explorando en el contexto del DCV.

Dado el relevante papel que el hipocampo desempeña en los procesos de memoria y aprendizaje, resulta fundamental comprender y profundizar sobre las alteraciones hipocampales en el contexto del DCV para identificar nuevas dianas terapéuticas en esta patología.

2.4 NEUROGÉNESIS EN EL HIPOCAMPO ADULTO

2.4.1 Estructura del hipocampo

El hipocampo es una estructura cerebral estudiada por los neuroanatómicos desde hace más 400 años. El término hipocampo, que procede del término griego caballito de mar, fue por primera vez acuñado por el anatomista Arantius en 1587.

A diferencia de otras áreas cerebrales, el hipocampo presenta una neuroanatomía perfectamente diferenciada morfológica y funcionalmente en varias

regiones: el **giro dentado** (GD) y el **cornu ammonis** (CA), el cual a su vez se subdivide en CA3, CA2 y CA1, principalmente. En conjunto, constituyen la denominada formación hipocampal.

2.4.1.1 *El giro dentado (GD)*

El giro dentado está formado por tres capas celulares (**Figura 5**). La **capa molecular** es la más externa y es la que presenta menor densidad celular. Se encuentra principalmente constituida por las dendritas de las células granulares y por los axones procedentes de la corteza entorrinal (CE). Por debajo de la capa molecular se sitúa la capa principal del GD denominada **capa granular**, formada por células granulares empaquetadas. Por último, la capa situada en la base de la capa granular se denomina **zona subgranular** (ZSG), región en la que se encuentra el **nicho neurogénico hipocampal** que se presentará más adelante.

Las **neuronas granulares** son las principales células del GD. Son células excitatorias, por lo que el principal neurotransmisor que liberan es el glutamato. Se caracterizan por presentar un soma elíptico con un árbol dendrítico con forma de cono proyectado hacia la capa molecular.

Aunque en menor proporción, en el GD también se encuentran un tipo de células denominadas *células musgosas*, las cuales están implicadas en la conexión hipocampal interhemisférica.

En la región más profunda de la capa granular existen unas células denominadas *células piramidales en cesto*. Como su nombre indica, presentan un soma de forma piramidal. Funcionalmente, son un tipo de interneuronas cuyos axones envuelven los somas y los axones de las células granulares, llevando a

cabo una modulación de la neurotransmisión de las mismas por medio de la liberación del neurotransmisor ácido γ -aminobutírico (GABA).

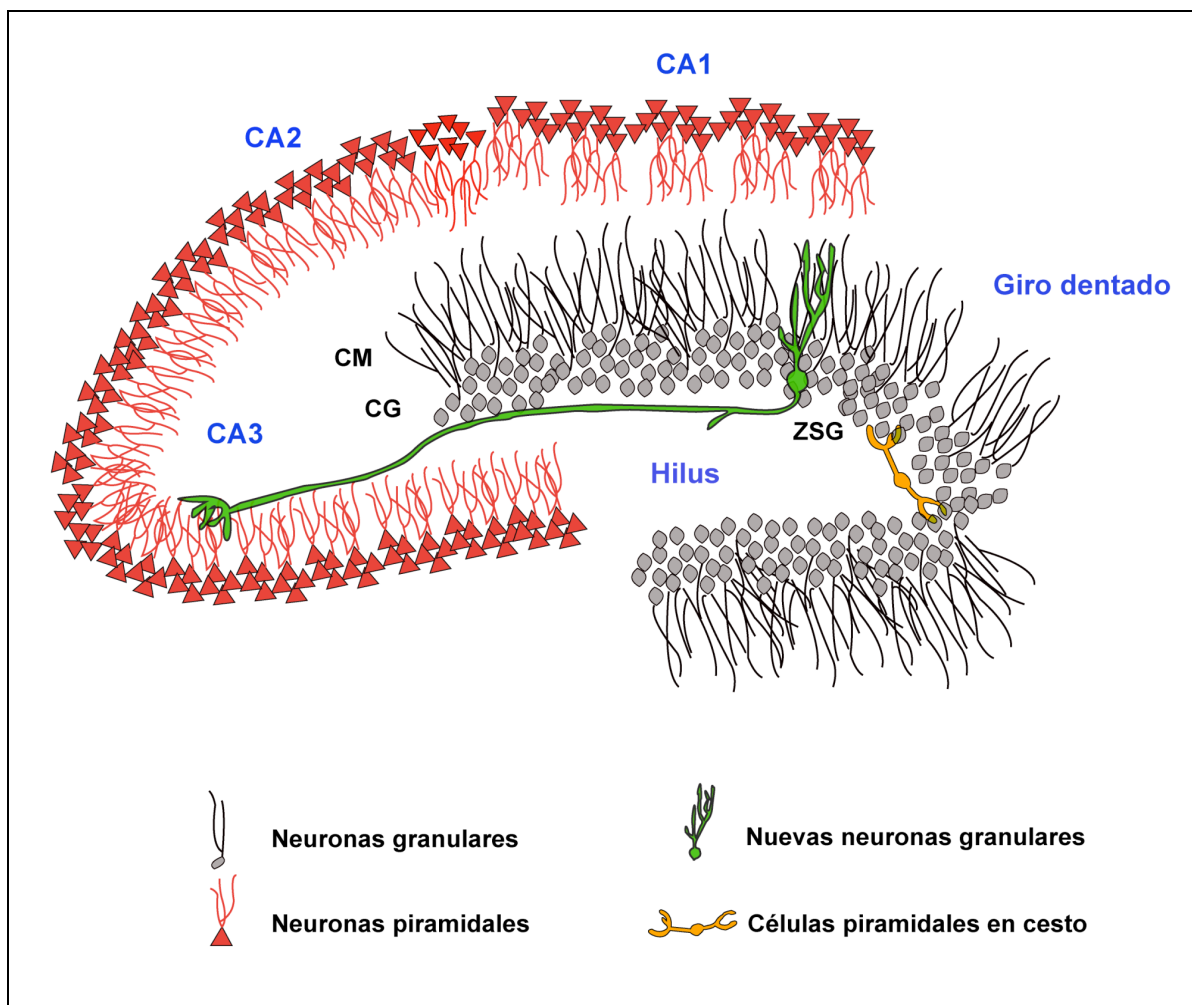


Figura 5. Anatomía de la formación hipocámpal. CM: Capa molecular; CG: Capa granular; ZSG: Zona subgranular; CA: *Cornu ammonis*.

2.4.1.2 *Cornu ammonis* (CA)

El principal tipo neuronal en la región del CA son las *células piramidales* (Figura 5). Las neuronas piramidales se caracterizan por presentar un árbol dendrítico basal y apical altamente ramificados. Mientras que las células piramidales de CA3 y CA2 presentan una alta variabilidad en cuanto a la longitud de su árbol dendrítico

dependiendo de donde estén situadas, la longitud dendrítica de las piramidales de CA1 es mucho más homogénea y reducida que las de CA3 y CA2.

2.4.2 Circuito hipocampal

El GD, las diferentes regiones del CA y la CE se encuentran altamente conectadas entre sí, dando lugar a los **circuitos hipocampales (Figura 6)**. La CE, la cual recibe gran cantidad de aferencias del resto de la corteza, es considerada como el punto de entrada de la información al resto del hipocampo por medio del denominado **tracto perforante (TP)** (Ramón y Cajal, 1893). A través del mismo, las células de la CE, principalmente de la capa II, proyectan sus axones hacia la capa molecular del GD (Steward and Scoville, 1976). Atendiendo al origen y la zona de sinapsis en la capa molecular del GD, el TP se subdivide en medial (TPM) y lateral (TPL). El 85% de estas sinapsis se establecen con las dendritas de las células granulares y en menor proporción con las interneuronas gabaérgicas (Nafstad, 1967).

A continuación, las células granulares proyectan sus axones hacia las células piramidales de CA3 a través de la vía de las *fibras musgosas*. Se calcula que cada célula granular es capaz de establecer sinapsis con hasta 15 neuronas piramidales de CA3. A su vez, CA3 se considera la principal fuente de aferencias de CA1 a través de los axones de sus células piramidales, conocidos como *colaterales de Schaffer*. Los axones de las neuronas piramidales de CA3 están altamente ramificados, pudiendo establecer sinapsis con las dendritas basales de varias piramidales de CA1 a la vez. Finalmente, las neuronas piramidales de CA1 dan lugar a dos proyecciones, una de ellas al *subiculum* (minoritaria) y la principal a la CE, cerrando de este modo el circuito hipocampal.

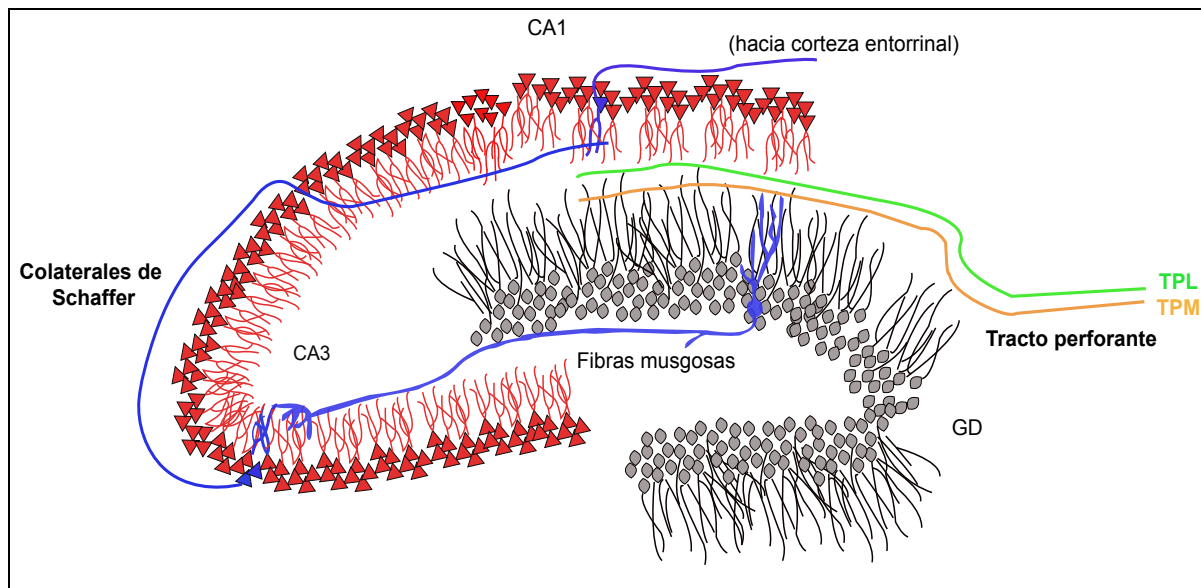


Figura 6. Principales conexiones de los circuitos hipocampales. TPL: Tracto perforante lateral; TPM: Tracto perforante medial.

2.4.3 Hipocampo: neurogénesis hipocampal

Actualmente, se sabe que en el cerebro adulto de mamíferos existen dos regiones neurogénicas generadoras de nuevas neuronas; la zona subventricular y la zona subgranular del hipocampo.

Desde los primeros neuroanatomistas de la historia, como es el caso del italiano Giulio Bizzozero, se planteó la posibilidad de la existencia de neurogénesis (generación de nuevas neuronas) en el cerebro adulto de los mamíferos. En el año 1894, Bizzozero realizó una clasificación de los diferentes tejidos atendiendo a sus capacidades proliferativas (Bizzozero, 1894). En esta clasificación estableció tres categorías: tejidos con capacidad proliferativa constante, tejidos con capacidad proliferativa ante determinados estímulos, y tejidos que carecen de capacidad proliferativa. Bizzozero colocó al sistema nervioso en esta última categoría.

Posteriormente, en 1912, Ezra Allen, mediante la tinción del ADN (ácido desoxirribonucleico) celular con tionina y basándose en criterios puramente morfológicos, describió por primera vez la presencia de células con capacidad mitótica situadas a lo largo de las paredes de los ventrículos laterales del cerebro adulto de ratas (Allen, 1912), lo que posteriormente se denominaría **zona subventricular (ZSV)**. Mediante esta técnica, aunque no se pudo comprobar que el resultado fuese la generación de nuevas neuronas, se obtuvo la primera evidencia de la presencia de células proliferativas en el sistema nervioso central así como la descripción de uno de los nichos neurogénicos en el cerebro adulto de mamíferos. No fue hasta la década de los 60 cuando se describió la presencia de células con capacidad mitótica en otra de las regiones del sistema nervioso central por Joseph Altman, quien identificó la inducción proliferativa en respuesta a lesiones corticales en ratas adultas mediante la administración de timidina tritiada, con la cual toda célula con capacidad mitótica quedaba marcada al incorporar este agente radioactivo en su ADN. Mediante esta técnica, Altman descubrió por primera vez, la generación de nuevas neuronas en la corteza del cerebro adulto de mamíferos (ALTMAN, 1962). Para discriminar entre la capacidad intrínseca de generación de nuevas neuronas en el cerebro y aquella ante la respuesta a daño, Altman llevó a cabo posteriormente un estudio en el que administró timidina en ratas sanas. Mediante esta aproximación, de nuevo, Altman encontró neuronas y células gliales marcadas a lo largo del neocórtex (ALTMAN and CHOROVER, 1963). Pero además, identificó por primera vez la existencia de lo que posteriormente se conocería como **zona subgranular (ZSG)**, el segundo nicho neurogénico en el cerebro adulto. Mediante el uso de autorradiografías fue capaz de detectar un gran número de nuevas neuronas en el giro dentado del hipocampo.

Más tarde, Michael Kaplan y James Hinds confirmaron la generación de nuevas neuronas en el cerebro adulto de ratas en el bulbo olfativo y en el hipocampo (Kaplan and Hinds, 1977), así como en la corteza visual (Kaplan, 1981). Mediante técnicas de microscopía electrónica fueron capaces de describir características fenotípicas neuronales en estas nuevas células generadas como son los axones, las sinapsis y las vesículas sinápticas. Finalmente, mediante la administración del análogo de timidina bromodeoxiuridina (BrdU) en pacientes terminales de cáncer, se logró identificar por primera vez en humanos la existencia de células con capacidad proliferativa tanto en la ZSV como en la ZSG del GD (Eriksson et al., 1998). A partir de su caracterización fenotípica, confirmaron que muchas de estas nuevas células generadas en el adulto eran neuronas maduras.

2.4.3.1 Maduración e integración de las nuevas neuronas

Como previamente se comentaba, el nicho neurogénico del giro dentado del hipocampo, que se denomina zona subgranular, es donde residen las células madre neurales (*neural stem cells; NSCs*). Las NSCs tienen que pasar por una serie de estadios en los que progresivamente irán adquiriendo características fenotípicas hasta convertirse en neuronas maduras totalmente funcionales dentro del circuito hipocampal (**Figura 7**). Entre la capa más profunda de la capa granular y el hilus del GD se localiza la ZSG, donde unas NSCs, conocidas como *células de glía radial quiescentes tipo 1*, se caracterizan por presentar su soma localizado en la ZSG y proyectar una única dendrita apical a lo largo de la capa granular. Las células de glía radial se encargan de mantener de manera constante la capacidad de generación de nuevas neuronas a lo largo de la vida del individuo. Estas células pueden dividirse asimétricamente, dando lugar a los denominados *progenitores neurales tipo 2* (**Figura 7**). Estos progenitores, también conocidos como células

amplificadoras transitorias, son células que poseen una alta capacidad proliferativa y cuya función consiste en la generación de un gran *pool* de progenitores destinados a convertirse en neuronas. Progresivamente, estos progenitores irán migrando desde las capas más profundas de la capa granular del GD e irán adquiriendo las características propias de neuronas maduras. La gran mayoría de estos progenitores darán lugar a neuronas granulares glutamatérgicas y, en menor proporción, a interneuronas gabaérgicas (Cameron et al., 1993; Gould et al., 1999; Liu et al., 2003). El proceso de maduración e integración de las nuevas neuronas sigue un proceso secuencial tanto temporal como funcionalmente (Espósito et al., 2005). Pasados 7 días aproximadamente desde su generación, una vez establecido el linaje hacia tipo neuronal, las nuevas “neuronas” todavía inmaduras inician su proceso de diferenciación y migran ligeramente desde la SGZ por las capas más internas de la CG del GD, donde proyectan una dendrita apical orientada hacia la capa molecular que carece todavía de conexión con los circuitos hipocampales y un axón inmaduro hacia la región de CA3. En esta etapa, estas células pueden ser activadas de forma tónica mediante estimulación gabaérgica (Snyder et al., 2009; Zhao et al., 2006). Posteriormente, cuando las nuevas neuronas inmaduras presentan entre 14-21 días de edad, comienzan a expresar los receptores glutamatérgicos NMDA (N-metil-D-aspartato), implicados en desarrollo neuronal y plasticidad sináptica (Figura 7). En este punto, la supervivencia de las nuevas neuronas depende de la estimulación glutamatérgica que reciban a través de estos receptores. Funcionalmente, estas neuronas se caracterizan por ser altamente excitables, como consecuencia de presentar tanto una resistencia de membrana como potenciales de reposo elevados (Espósito et al., 2005).

Entre 21-28 días de edad, se producirá la generación y maduración de las espinas dendríticas así como de los terminales sinápticos en los axones, dando lugar a la remodelación e integración de las nuevas conexiones en los circuitos hipocampales (Toni et al., 2008; Toni et al., 2007; Yasuda et al., 2011; Zhao et al., 2006). En comparación con las neuronas maduras, las nuevas neuronas presentan una mayor plasticidad sináptica (poseen un umbral más reducido para producir la potenciación a largo plazo). Este efecto es mediado por el alto contenido de la subunidad NR2B de los receptores NMDA (Ge et al., 2007). Este hecho, junto con su mayor excitabilidad, permite a las nuevas neuronas una mayor discriminación e incorporación de nueva información en los circuitos hipocampales respecto a las neuronas maduras, en los procesos de memoria y aprendizaje (Figura 7).

Alcanzadas las 8 semanas de edad, aunque las nuevas neuronas pueden seguir experimentando modificaciones a nivel de densidad, maduración de espinas dendríticas y terminales sinápticos en CA3, presentan características electrofisiológicas similares a las de las neuronas maduras.

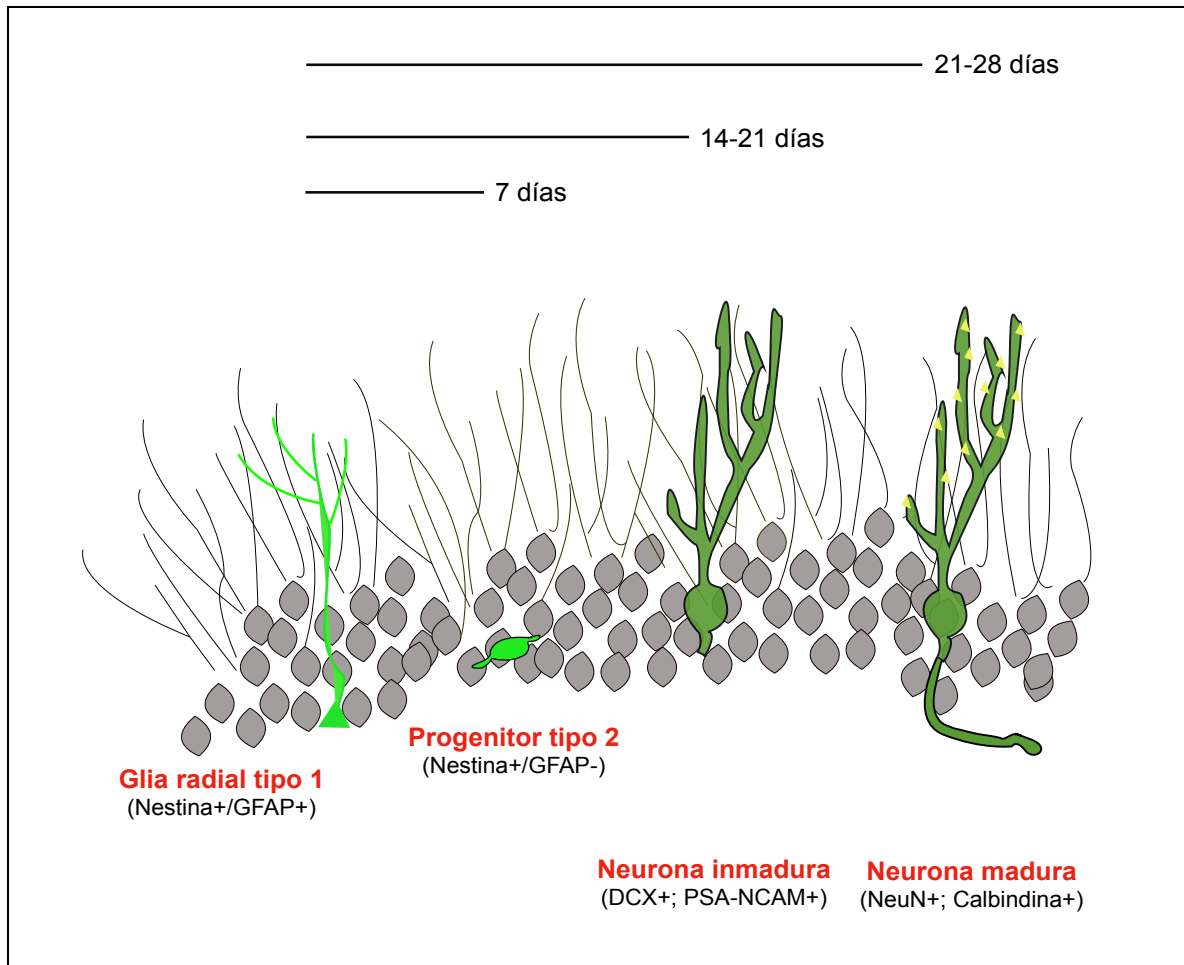


Figura 7. Perfil temporal de la maduración de las nuevas neuronas granulares en el giro dentado durante la neurogénesis adulta. GFAP: Proteína fibrilar ácida de la glía (marcador de células madre neurales y astrocitos); DCX: Doble cortina (marcador de nuevas neuronas inmaduras); NeuN: Núcleo neuronal y Calbindina (marcadores de neuronas maduras funcionales).

2.4.3.2 Implicaciones funcionales de la neurogénesis hipocampal

Actualmente, son muchos los estudios que apoyan el papel de la neurogénesis en la modulación de los procesos de memoria y aprendizaje hipocampal. La neurogénesis hipocampal tiene lugar en la región del hipocampo, por donde tiene que “pasar” toda la información procedente de la CE antes de que ésta pueda ser almacenada a lo largo de los circuitos hipocampales. Por tanto, este “cuello de botella” se considera como un punto estratégico en el cual las nuevas neuronas

granulares adultas participan en el procesamiento de las aferencias procedentes del entorno y en la plasticidad hipocampal (Richards and Frankland, 2017). Como previamente se comentaba, la neurogénesis hipocampal desempeña un papel importante en el remodelado y la función de los circuitos hipocampales. Las nuevas neuronas generadas poseen una serie de características electrofisiológicas que les permite diferenciarse de las neuronas granulares maduras, presentando una mayor capacidad de lanzar potenciales de acción en respuesta a estímulos externos dada su alta excitabilidad intrínseca (Aimone et al., 2011; Aimone et al., 2009). Dado el alto número de nuevas neuronas que se generan en el GD de roedores adultos (que contiene aproximadamente 1.000.000), se estima que potencialmente cada neurona que forma la región CA3 (aproximadamente 500.000 células) podría tener un contacto directo con cada una de las nuevas neuronas generadas (Snyder et al., 2012). Por todo ello, dada la alta capacidad de respuesta y conectividad de éstas, la neurogénesis hipocampal adulta se considera como un mecanismo fundamental en la modulación de los procesos de memoria y aprendizaje dependientes del hipocampo.

2.4.3.3 Efecto anterógrado y retrógrado de la neurogénesis en el aprendizaje y la memoria

Existe un amplio consenso en cuanto a la participación de la neurogénesis hipocampal adulta en los procesos de aprendizaje y memoria. Por medio de diferentes aproximaciones experimentales se ha identificado el impacto de la modulación de la neurogénesis sobre la memoria. Así, el momento de la presentación de un nuevo estímulo respecto al momento de la generación de las nuevas neuronas es un factor clave para entender las funciones de la neurogénesis hipocampal adulta sobre el aprendizaje y la memoria. La mayor parte de los

estudios se han focalizado en analizar la capacidad de aprendizaje tras una modulación previa de la neurogénesis, lo que se denomina **efecto anterógrado de la neurogénesis (Figura 8)**. En el GD, la mayor parte de las neuronas granulares maduras se encuentran silentes ante la llegada de nuevos estímulos del entorno (Alme et al., 2010), a diferencia de las nuevas neuronas generadas las cuales, dada su alta excitabilidad intrínseca, son las principales encargadas del procesamiento de los nuevos *inputs* participando así en la formación de las nuevas memorias (Ge et al., 2007; Marín-Burgin and Schinder, 2012; Mongiat et al., 2009; Ramirez-Amaya et al., 2006; Schmidt-Hieber et al., 2004; Stone et al., 2011; van Praag et al., 2002). De este modo, previamente a un nuevo aprendizaje, el incremento y/o la disminución de la supervivencia de las nuevas neuronas, supondrá respectivamente, una mejora o un empeoramiento de la capacidad de incorporación de esa nueva información en los circuitos de la memoria (Clelland et al., 2009; Kheirbek et al., 2013; Sahay et al., 2011).

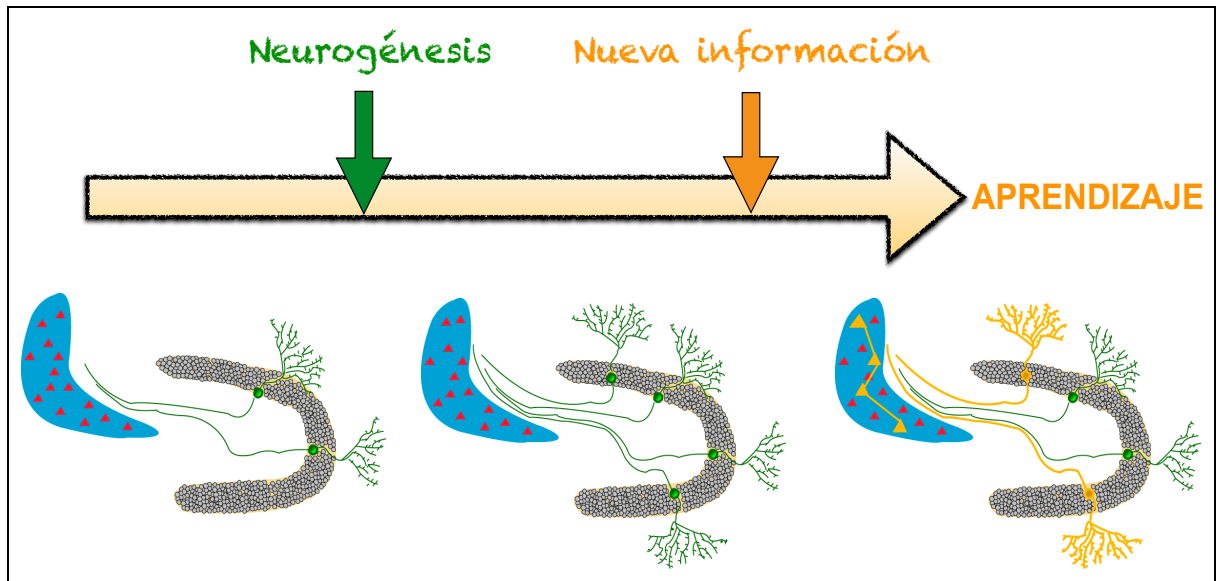


Figura 8. Efecto anterógrado de la neurogénesis en la memoria. La estimulación de la neurogénesis supone la incorporación de nuevas células (representadas en verde) en los circuitos de la memoria. Tras el estímulo neurogénico, la activación de células concretas en el giro dentado y en CA3 (representado en amarillo) facilita el almacenamiento de nueva información en los circuitos.

El estudio de los efectos anterógrados de la neurogénesis ha permitido identificar su relevancia en los procesos de aprendizaje. Sin embargo, hasta recientemente no se ha empezado a comprender el papel que juegan las nuevas neuronas generadas en las memorias previamente establecidas, lo que se conoce como **efecto retrógrado de la neurogénesis** (Figura 9).

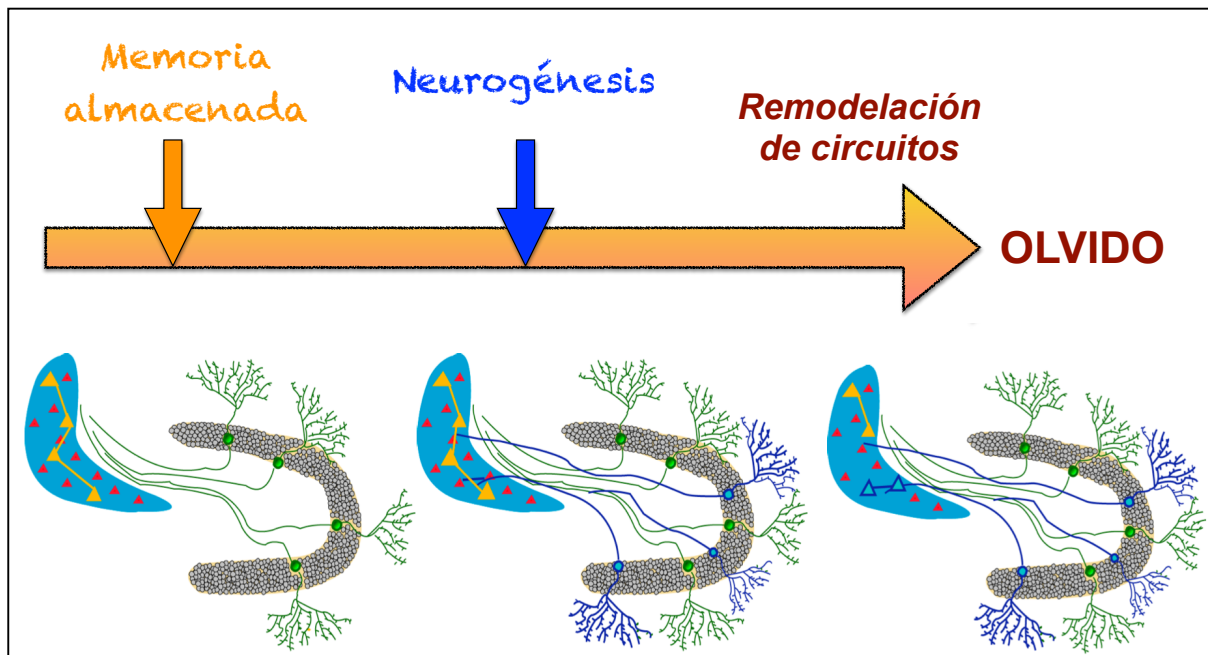


Figura 9. Efecto retrógrado de la neurogénesis en la memoria. La memoria se encuentra almacenada en los circuitos hipocampales (representado en amarillo). La potenciación de la neurogénesis supone la incorporación de nuevas neuronas y establecimiento de conexiones (representadas en azul) en la circuitería preexistente. La remodelación producida tras la integración de las nuevas neuronas supone el debilitamiento de la conectividad interneuronal donde inicialmente se almacenaban las memorias.

Actualmente, los modelos más aceptados que explican el efecto retrógrado de la neurogénesis hipocampal adulta son los modelos aditivos (Chambers et al., 2004; Deisseroth et al., 2004; Meltzer et al., 2005; Weisz and Argibay, 2012) y de reemplazamiento (Epp et al., 2007; Leuner et al., 2004). Éstos proponen que tanto la continua integración de las nuevas neuronas generadas como la remodelación sináptica provocada en los circuitos hipocampales y el reemplazo de las antiguas neuronas maduras son capaces de producir el olvido de ciertas memorias preestablecidas. Esta remodelación de los circuitos supone, por tanto, una reducción en la probabilidad de que, ante la aparición de un determinado estímulo del ambiente, se lleve a cabo la activación específica de las neuronas que se

encargaron de codificar/almacenar inicialmente la información (**engram**), dificultándose así el acceso a una memoria concreta, lo que explicará su **olvido** (*“forgetting”*) (Frankland et al., 2013; Josselyn and Frankland, 2012).

El proceso de olvido puede explicarse como resultado de las características intrínsecas de la neurogénesis. A medida que las nuevas neuronas generadas van adquiriendo sus características fenotípicas, comienzan a integrarse estableciendo sinapsis en los circuitos hipocampales donde se encuentra almacenada la memoria. Dado que el sustrato es limitado, durante este proceso se producirá una competición entre las sinapsis preestablecidas y las nuevas conexiones (Toni et al., 2008; Toni et al., 2007; van Praag et al., 2002). Esta remodelación tendrá como consecuencia la progresiva degradación e incluso la eliminación de la información almacenada en los circuitos preexistentes. Dado que para el recuerdo resulta fundamental la activación de redes neuronales específicas, la modificación tanto cualitativa como cuantitativa de las conexiones que forman esta red conducirá al olvido de dicha información.

Previamente se comentaba la hiperexcitabilidad intrínseca que presentan las nuevas neuronas granulares generadas en el adulto. Se piensa que esta característica también explicaría el proceso de olvido por tres vías. La primera consistiría en **una distorsión del sistema**, dando lugar a una mayor dificultad para que se produzca el recuerdo. En general, en el GD, la relación “señal-ruido” producido por las neuronas granulares maduras es bajo. Sin embargo, la continua incorporación de nuevas neuronas inmaduras aporta una significativa cantidad de “ruido” al sistema, lo que podría interferir en el proceso del recuerdo y, por lo tanto, potenciar el olvido. En segundo lugar, durante el proceso de recuerdo, debido a la hiperexcitabilidad de las nuevas neuronas ante la respuesta a señales externas,

podría introducirse ruido al sistema, dificultándose así la activación del engrama (proceso conocido como “**compleción de patrones**”) y, por tanto, promoviendo el olvido (Meltzer et al., 2005). Por último, existen diversos estudios que apoyan la idea de que el incremento de excitabilidad en el circuito hipocampal como consecuencia de la neurogénesis podría provocar un estado de “hiperexcitación” deletéreo para el funcionamiento del hipocampo (como ocurre, por ejemplo, en los casos de epilepsia). En este contexto, tanto en el GD como en CA3 se podría producir una respuesta homeostática con el objeto de disminuir esta hiperactividad (Brickley et al., 2001; Deisseroth et al., 2004; Restivo et al., 2015), basada en el silenciamiento de sinapsis (Frankland et al., 2013; Meltzer et al., 2005). Dado que estas sinapsis estarán implicadas en el almacenamiento de determinadas memorias, su silenciamiento dificultará el acceso a las mismas y por lo tanto facilitará su olvido.

2.4.3.4 Modulación de la neurogénesis hipocampal en un contexto fisiológico y patológico

Como anteriormente se comentaba, la neurogénesis hipocampal adulta juega un papel clave en la memoria y el aprendizaje. A su vez, la neurogénesis es un proceso que se encuentra modulado por numerosos factores tanto de carácter **extrínseco** como **intrínseco**. Los primeros hacen referencia a experiencias externas que estimulan la neurogénesis a través del impacto que tienen sobre la circuitería hipocampal. Uno de los principales factores extrínsecos más estudiados que modulan la neurogénesis es el **aprendizaje dependiente del hipocampo**. Se ha visto que el aprendizaje de tareas hipocampo-dependientes, incrementa el número de nuevas neuronas granulares (Epp et al., 2007; Gould et al., 1999; Leuner et al., 2006). Igualmente, se ha comprobado que el aprendizaje de tipo

espacial fomenta de manera positiva la neurogénesis, promoviendo un aumento en la supervivencia de las nuevas neuronas generadas (Dupret et al., 2008).

El **enriquecimiento ambiental** es otro de los factores extrínsecos moduladores de la neurogénesis mejor conocidos. Se ha observado que el enriquecimiento ambiental potencia la neurogénesis hipocampal incrementando la supervivencia de las nuevas neuronas. De hecho, a nivel experimental se ha comprobado que una semana de enriquecimiento es suficiente para incrementar la tasa de supervivencia de las nuevas neuronas (Kempermann et al., 1997; Tashiro et al., 2007).

Otro de los factores extrínsecos más estudiados es el **ejercicio físico**. Éste no solo mejora el estado físico del individuo sino también su capacidad cognitiva junto con otras funciones cerebrales (van Praag, 2009). En roedores se ha visto que correr de manera voluntaria no solo incrementa la proliferación de las NSCs en la ZSG tanto en animales jóvenes como envejecidos (van Praag et al., 1999a; van Praag et al., 2005) sino también la actividad de los circuitos hipocampales y la capacidad cognitiva. Aunque no se encuentran perfectamente definidos los mecanismos por los que este tipo de ejercicio físico promueve estos efectos, se ha observado que correr de forma voluntaria potencia los procesos angiogénicos así como la producción y liberación de BDNF (van Praag, 2009).

Por otro lado, en el propio hipocampo existen una serie de mecanismos moleculares llevados a cabo por diferentes factores de transcripción (FT) que así mismo contribuyen a modular los procesos de proliferación y diferenciación neuronal durante la neurogénesis hipocampal. Estos son los considerados como los **factores modulares intrínsecos** de la neurogénesis. Son múltiples los FTs

implicados en estos procesos pero entre ellos cabe destacar los **factores de transcripción de la familia básico-Hélice-Lazo-Hélice (bHLH)**. Los bHLH son una superfamilia de factores de transcripción implicados en las funciones previamente citadas. En cuanto al control de la autorenovación de las NSCs, el factor Hes-5, que pertenece a la ruta de señalización de Notch, se expresa tanto en las NSCs tipo-1 quiescentes como en las proliferativas (Lugert et al., 2010). Se ha visto que la disminución de sus niveles provoca la entrada en ciclo de las NSCs iniciando la generación de nuevas neuronas. El FT Ascl1 (también conocido como Mash1) se expresa principalmente en las NSCs tipo 2, promoviendo la diferenciación hacia un fenotipo neuronal en el GD (Kim et al., 2007). Posteriormente, la transición de las NSCs de tipo 2a a tipo 2b es producido por un incremento en los niveles del factor Neurogenina-2. A continuación, la elevación de los niveles del factor NeuroD1 indicará el establecimiento del linaje a tipo neuronal por parte de la NSC. En este estadio también se coexpresan marcadores típicos como PSA-NCAM (*Polysialylated neural cell adhesión molecule*) y DCX (*Doublecortin*) (Roybon et al., 2009; Seki, 2002). Una vez proliferado y establecido el linaje neuronal, la todavía neurona inmadura irá extendiendo progresivamente sus ramificaciones, integrándose en los circuitos hipocampales.

Aunque se conocen las funciones que muchos de estos factores desempeñan en la neurogénesis hipocampal adulta, existen muchos bHLH cuya función todavía no está claramente definida. El estudio de las funciones de estos nuevos bHLH ampliará el conocimiento de los mecanismos reguladores de la neurogénesis hipocampal, lo que permitirá el desarrollo de posibles nuevas estrategias y dianas sobre las que actuar en un contexto patológico en el que se pueda encontrar alterada la función hipocampal.

De hecho, se ha visto que la neurogénesis hipocampal así como la integración de las nuevas neuronas pueden verse alteradas ante determinados contextos neuropatológicos. Por ejemplo, en modelos experimentales de epilepsia, se ha visto un incremento en los niveles de proliferación, migración ectópica, así como una arborización aberrante y una integración acelerada de las nuevas neuronas generadas como consecuencia de las modificaciones en los patrones de actividad del circuito hipocampal (Jessberger et al., 2007; Parent et al., 2006; Parent et al., 1997). En modelos animales de la enfermedad de Parkinson, la acumulación de la proteína α -sinucleína provocaba una reducción de la neurogénesis hipocampal junto con un desarrollo morfológico aberrante de las nuevas neuronas integradas (Winner et al., 2012). En relación a la EA, aunque no está totalmente establecido dada la diversidad de modelos animales, durante el desarrollo y progresión de la enfermedad se han detectado cambios en las tasas proliferativas (Lazarov et al., 2010; Marlatt and Lucassen, 2010; Mirochnic et al., 2009; Mu and Gage, 2011). En la enfermedad de Huntington, en diferentes modelos animales se ha demostrado una reducción en la tasa de proliferación de los progenitores (Kohl et al., 2007; Lazic et al., 2004), así como en la tasa de integración de nuevas neuronas (Fedele et al., 2011; Peng et al., 2008). En el contexto del ictus igualmente se ha demostrado que el daño isquémico provoca una respuesta neurogénica. La mayor parte de los estudios realizados en la neurogénesis tras ictus se han centrado en la ZSV. En éstos, se ha observado que la isquemia provoca un aumento en la tasa de proliferación, donde el número de células proliferativas se mantiene elevado hasta al menos dos semanas después de la isquemia (Arvidsson et al., 2002; Zhang et al., 2004b). Dada la cercanía en algunas regiones de la ZSV al daño isquémico; en muchas ocasiones se ha

considerado esta potenciación neurogénica como un mecanismo endógeno neurorreparador, sobre el que poder actuar exógenamente con el objetivo de “repoblar” parte del tejido dañado. En este contexto, varios estudios han identificado la presencia de nuevas neuronas tanto inmaduras como integradas en la corteza infartada procedentes de la respuesta neurogénica de la ZSV (Ohab et al., 2006; Thored et al., 2007). Aunque la tasa de supervivencia de estas nuevas neuronas parece verse limitada con el tiempo, varios estudios demuestran que éstas son potencialmente capaces de liberar diferentes factores tróficos que podrían favorecer mecanismos de plasticidad durante la fase crónica del ictus (Moskowitz et al., 2010). Respecto a la neurogénesis hipocampal tras ictus, diversos trabajos han demostrado que la isquemia igualmente provoca una respuesta neurogénica en la ZSG del hipocampo (Arvidsson et al., 2001; Kernie and Parent, 2010) y que la isquemia podría estar potenciando fenómenos de migración ectópica junto con un desarrollo morfológico anormal en las nuevas neuronas granulares (Niv et al., 2012; Woitke et al., 2017).

Teniendo en cuenta todo lo anterior, la caracterización de las alteraciones neurogénicas hipocampales ante determinados contextos patológicos puede ser considerado como el primer paso para desarrollar futuros tratamientos para sus trastornos cognitivos asociados.

2

INTRODUCCIÓN PARTE II

2.5 EL RECEPTOR PARA HIDROCARBUROS AROMÁTICOS (AHR)

2.5.1 Perspectiva histórica

Los pesticidas, disolventes y otras sustancias químicas industriales de bajo peso molecular son conocidos como xenobióticos y se consideran una de las mayores fuentes de contaminación ambiental. Son múltiples los ejemplos en los que se ha podido comprobar los riesgos para la salud pública que supone la exposición a los hidrocarburos aromáticos policíclicos o a hidrocarburos aromáticos halogenados (*PAHs* y *HAHs*, respectivamente) (Vanden Heuvel et al., 1993). Uno de los ejemplos más comunes es la exposición deliberada o accidental a dioxinas o TCDDs (2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina), pertenecientes a la familia de los HAHs. Entre éstas, destaca la que se produjo durante la guerra de Vietnam (1955-1975), por el empleo por parte de los Estados Unidos del denominado “Agente Naranja”, un herbicida y defoliante esparcido sobre los

bosques de Vietnam, Laos y Camboya con el objetivo de deforestar bosques y pueblos. No fue hasta 1964 cuando se informó de los posibles riesgos que suponía la exposición a este compuesto por parte de una de sus principales productoras. Sin embargo, el agente naranja siguió esparciéndose sobre territorio vietnamita causando *a posteriori* terribles secuelas en ambos bandos contendientes (Kim et al., 2003).

Actualmente, se llevan cabo exhaustivos controles para la detección de dioxina así como de otros tipos de PAHs y HAHs. Según la OMS, es bastante frecuente la identificación de dichos compuestos en productos alimentarios. Por ejemplo, en los años 2007 y 2008 destaca la detección de altos niveles de dioxinas en la goma guar (un aditivo alimentario) y en carne de origen porcino en India e Irlanda, respectivamente.

El origen de la investigación en el receptor de hidrocarburos aromáticos (AhR) se produce en el campo de la toxicología. Entre los años 1960-1970, los estudios centrados en el metabolismo de los xenobióticos demostraron por primera vez que la exposición a estas sustancias promovía la inducción de una serie de enzimas encargadas de promover tanto los efectos deletéreos de estos compuestos como la protección del organismo frente a los mismos (Conney, 1982; Schrenk, 1998; Shimada, 2006). A partir de estos estudios, se observó que diferentes cepas de ratón respondían de manera diferencial ante la exposición a los xenobióticos (Niwa et al., 1975; Poland et al., 1974). El análisis de cruces entre cepas de ratón que respondían a los xenobióticos con otras que carecían de dicha capacidad demostró que el responsable de este fenómeno era un único locus autosómico dominante, al que se denominó Ah (*aryl hydrocarbon responsiveness*) (Poland et al., 1987). Este receptor fue caracterizado como receptor *bona fide* para

este tipo de compuestos químicos, responsable directo de los efectos tóxicos y carcinógenos de los xenobióticos. Actualmente, este receptor es conocido como **receptor de hidrocarburos aromáticos** (AhR, de su nombre en inglés, *Aryl Hydrocarbon Receptor*). También es conocido como **receptor de dioxina** (Fernandez-Salguero et al., 1996), dado que la dioxina es uno de sus agonistas mejor caracterizados.

Aunque las principales funciones atribuidas a AhR se deben a su papel en el metabolismo de xenobióticos (Wilson and Safe, 1998), en los últimos años se le han ido atribuyendo diferentes funciones a nivel fisiológico.

2.5.2 AhR: factor perteneciente a la familia bHLH/PAS

Estructuralmente, el receptor AhR es un factor de transcripción activado por ligando que pertenece a la superfamilia de proteínas bHLH/PAS (Per-ARNT-Sim). En esta familia se encuentran FTs implicados en diversos contextos como son la regulación del metabolismo de xenobióticos, la hipoxia, la regulación de ritmos circadianos, el desarrollo del sistema nervioso (Kewley et al., 2004), así como en la función hipocampal previamente comentada.

Funcionalmente, estas proteínas requieren de la dimerización con otro miembro de la familia PAS para formar un complejo multiproteico funcional (Taylor and Zhulin, 1999). En el caso de AhR, dimeriza con ARNT (Traslocador del receptor para hidrocarburos aromáticos). Este proceso de dimerización se lleva a cabo por el alto grado de conservación de los dominios tipo PAS.

El dominio PAS, localizado en el extremo N-terminal del receptor, es una región de entre aproximadamente 230-300 aminoácidos, formada por dos repeticiones adyacentes altamente degeneradas, denominadas PAS A y PAS B. En

el extremo N-terminal también se localiza el dominio bHLH, que es un motivo necesario que permite su unión a regiones promotoras específicas (E-Box) del ADN correspondientes a sus genes diana. Por otro lado, en el extremo C-terminal se localizan los dominios implicados en la transactivación o represión.

Dependiendo de la formación de homo- y/o heterodímeros, las proteínas de la familia PAS pueden subdividirse en dos grupos principales (**Figura 10**): proteínas bHLH/PAS de tipo I, como AhR, HIF-1 α (Factor inducible por hipoxia-1 α) y Sim (*Single-minded*), que carecen de capacidad de dimerizar con proteínas de su misma clase, formando solo heterodímeros con las proteínas bHLH/PAS de tipo II, entre las que destacan ARNT, Per (Periodo) y BMAL (Proteína similar a ARNT de cerebro y músculo), las cuales poseen la capacidad de formar tanto hetero- como homodímeros (Crews and Fan, 1999; Kewley et al., 2004).

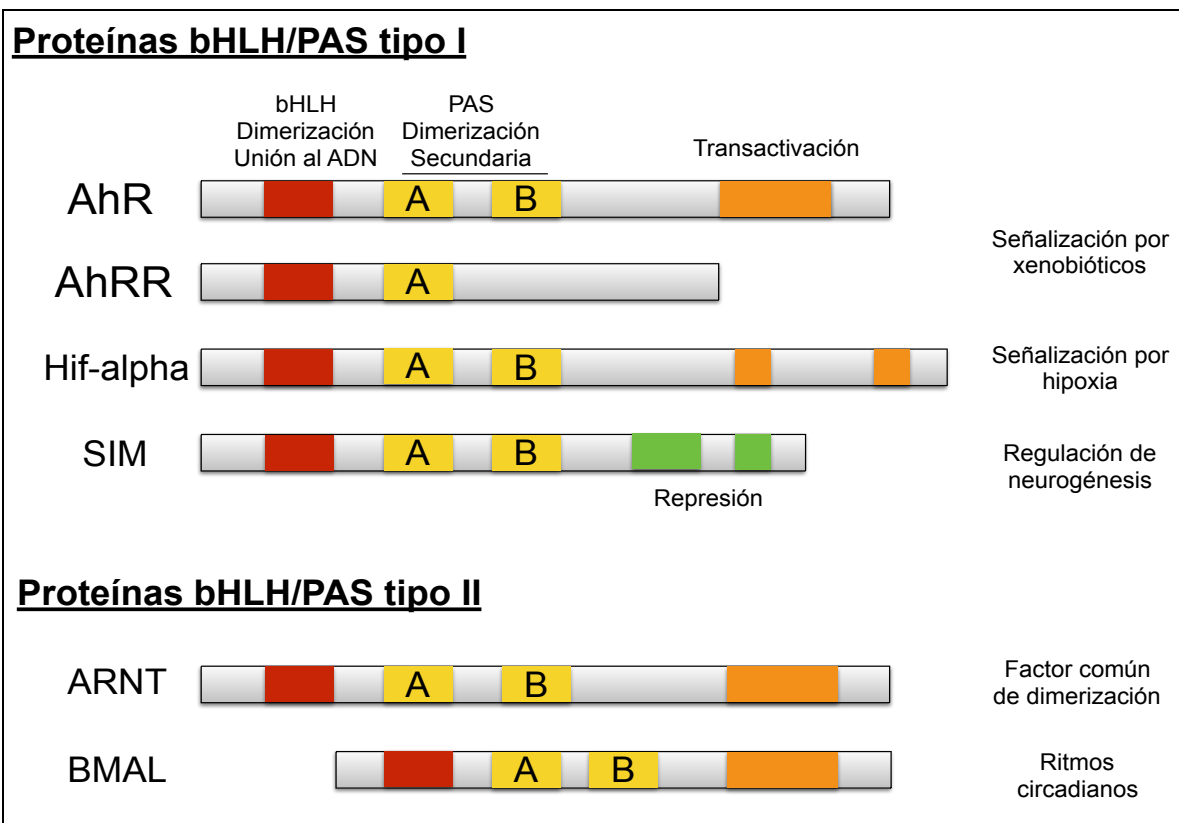


Figura 10. Miembros de la familia de proteínas bHLH/PAS. El dominio estructural hélice-bucle-hélice se representa en rojo. El dominio PAS, con sus dos repeticiones, PAS A y PAS B, se representa en amarillo. Los dominios TAD (en naranja) y represión (en verde) se sitúan en el extremo C-terminal (Esquema adaptado de Kewley et al., 2004).

2.5.3 Rutas de señalización clásicas de AhR dependientes de ligando

Como previamente se comentaba, AhR es un factor de transcripción que posee un dominio de unión a ligando que le permite actuar a modo de receptor. De este modo, la unión de un ligando agonista desencadenará la denominada vía canónica de activación. Los dos tipos de ligandos principales que activan a AhR son los compuestos xenobióticos y los ligandos endógenos o naturales (Nguyen and Bradfield, 2008).

2.5.3.1 Agonistas de AhR: compuestos xenobióticos y ligandos endógenos o naturales

Compuestos xenobióticos

La mayoría de los agonistas de AhR se caracterizan por su naturaleza hidrofóbica. Se distinguen tres clases principales: los HAHs, los PAHs y los PCBs (bifeniles policlorados) (**Tabla 2**) (McKinney and Singh, 1981; Poland and Glover, 1977).

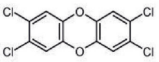
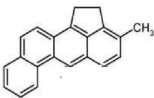
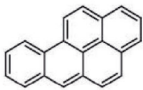
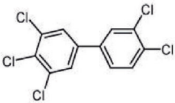
Familia	Compuesto	Estructura	Fuente	Referencias
HAHs	TCDD o Dioxina		La introducción de estos compuestos en el ambiente se produce a través de productos comerciales, como resultado de accidentes industriales o por residuos de incineración	Ver referencias 1-6 en el pie de Figura
PAHs	3-metilcolantreno benzo-[a]-pireno	 	Resultado de procesos de combustión, encontrándose en hollín, alimentos a la parrilla y humo procedente del tubo de escape de los coches	Ver referencias 7-11 en el pie de Figura
PCBs	3,3',4,4',5'-penta-clorobifenil		Se encuentran en productos comerciales como pegamentos, productos resistentes al fuego, y materiales aislantes	Ver referencias 12-14 en el pie de Figura

Tabla 2. Principales ligandos xenobióticos activadores de AhR. (1-6) (Higginbotham et al., 1968; Nguyen and Bradfield, 2008; Niwa et al., 1975; Poland and Knutson, 1982; Schwetz et al., 1973); **(7-11)** (Barron et al., 2004; Conney, 1982; Poland et al., 1974); **(12-14)** (Bandiera et al., 1982; Safe, 1993; Safe et al., 1985).

Ligandos endógenos o naturales

Como previamente se ha comentado, la función más conocida de AhR es la de desencadenar los efectos tóxicos y carcinógenos de compuestos

potencialmente peligrosos producidos por el ser humano. Dado que AhR se encuentra a lo largo de toda la filogenia llevando a cabo funciones completamente diferentes (como más adelante se comentará), esta función del receptor ha debido de ser posteriormente adquirida a lo largo de la evolución. Por tanto, deben existir agonistas endógenos o naturales en el organismo para este receptor. Actualmente, se han descrito varios agonistas endógenos de AhR (**Tabla 3**) (Nguyen and Bradfield, 2008). A pesar de sus bajas concentraciones a nivel basal, los cambios en sus niveles de manera local en determinados tejidos, como consecuencia de procesos fisiológicos concretos o situaciones patológicas, los sitúan como candidatos capaces de activar AhR. Estos compuestos pueden ser adquiridos a través de la dieta, pero también sintetizados de manera endógena por el organismo como, por ejemplo, los derivados del ácido araquidónico, metabolitos del grupo hemo, fotoderivados del triptófano y derivados del triptófano.





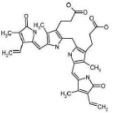



Clase	Compuesto	Estructura	Características	Referencias
Compuestos de la dieta	Indol-3-carbinol		Presente en vegetales como el brócoli y las coles de bruselas	Ver referencias 1-6 en el pie de Figura
	Quercetina		Flavonoides de tipo natural	
Derivados del ácido araquidónico	Prostaglandinas		El metabolismo del AA se lleva a cabo de manera principal por las enzimas ciclooxigenasas (COX-1 y COX-2), a través de las cuales se generan prostaglandinas, y por las lipoxigenasas (5-, 12- y 15-LOX), cuyos productos principales incluyen leucotrienos y lipoxinas, 6 prostaglandinas (B2, D2, F3, G2, H1 y H2), así como la LXA4 (lipoxina A4), son activadores de AhR.	Ver referencias 7-11 en el pie de Figura
	Lipoxina A4			
Metabolitos del grupo hemo	Bilirrubina		La bilirrubina se encuentra conjugada a la albúmina del suero, por lo que sus niveles libres son tan bajos que imposibilitan su actuación como ligando de AhR. En el síndrome de Crigler-Najar o la ictericia cursan con incremento de los niveles plasmáticos de la bilirrubina libre, posibilitando la activación de AhR.	Ver referencias 12-14 en el pie de Figura
Fotoderivados del triptófano	6-formilindolo-[3,2-b]carbazol		La irradiación UV del triptófano genera FICZ (6-formilindolo-[3,2-b]carbazol y dFICZ (6, 12-diformilindolo-[3,2-b]carbazol, agonistas de AhR. Ambos se han implicado en el control de los ritmos circadianos, y en modulación del sistema inmune tras la exposición a UV.	Ver referencias 15-17 en el pie de Figura
Ruta de los indoles	Ácido-indol acético		La ruta de los indoles se da principalmente en el tracto gastrointestinal. El metabolismo del triptófano produce: triptamina, ácido indol-acético (AIA) e indol. Estos compuestos actúan como agonistas de AhR	Ver referencias 18-21 en el pie de Figura
Ruta de las kinureninas	L-kinurenina		La ruta de las kinureninas consiste en la degradación del L-triptófano en diferentes metabólicos para la producción del cofactor NAD. Varios metabólicos de esta ruta como L-kinurenina y el ácido kinurénico son agonistas de AhR.	Ver referencias 22-26 en el pie de Figura

Tabla 3. Ligandos endógenos y/o naturales que activan a AhR. (1-4) (Ciolino et al., 1999); **(5-10)** (Machado et al., 2006; Sanchez et al., 2010; Schaldach et al., 1999; Seidel et al., 2001); **(11-14)** (Phelan et al., 1998; Sinai y Bend, 1997); **(15-17)** (Helferich y Denison, 1991; Rannug et al., 1995); **(18-21)** (Nguyen y Bradfield, 2008; Vikström Bergander et al., 2012); **(22-26)** (Adams et al., 2012; DiNatale et al., 2010; Hao et al., 2013; McBerry et al., 2012; Opitz et al., 2011).

2.5.3.2 Ruta canónica de señalización del receptor AhR

En ausencia de agonista, la mayor parte de AhR se localiza a nivel citoplasmático o, dependiendo del tipo celular, entre el citoplasma y el núcleo (Pollenz et al., 1994; Singh et al., 1996). En el citoplasma, AhR se encuentra interaccionando con la chaperona HSP90 (Proteína de choque térmico 90) (Denis et al., 1988; Perdew, 1988), con la co-chaperona p23 (Kazlauskas et al., 1999) con una proteína de tipo immunofilina conocida como ARA9 (proteína asociada al receptor AhR), y con una proteína de tipo XAP2 (Proteína asociada al virus de la hepatitis B) o AIP1

(Proteína de interacción con AhR) (Carver and Bradfield, 1997; Ma and Whitlock, 1997; Meyer et al., 1998), formando un complejo transcripcionalmente inactivo (Figura 11).

En presencia de un ligando agonista, AhR experimenta un cambio conformacional exponiendo una señal de localización nuclear (señal bipartita, localizada en los aminoácidos 13-17, 37-42) (Ikuta et al., 1998). La importina- β (Petrulis et al., 2003) reconocerá dicha señal, facilitando la traslocación nuclear de AhR, junto al complejo citosólico HSP90/p23/XAP2 (Heid et al., 2000; Lees and Whitelaw, 1999). Una vez en el núcleo, se produce el intercambio de este complejo por la proteína ARNT (Reyes et al., 1992; Swanson et al., 1995), dando lugar a un heterodímero capaz de unirse a regiones promotoras de los genes dianas, conocidos como DRE o XRE (elementos de respuesta a dioxina o elementos de respuesta a xenobióticos, respectivamente), cuya secuencia consenso es 5'-TnGCGTG A/G G/C A-3' (Denison et al., 1988; Watson and Hankinson, 1992). Los genes diana mejor estudiados son aquellos que codifican para varias de las enzimas responsables del metabolismo de xenobióticos como Cyp1a1, Cyp1a2, Cyp1b1, subunidades de la glutatión S-transferasa, NADPH/quinona oxidorreductasa y aldehído deshidrogenasa (Furness and Whelan, 2009; Hankinson, 1995). Sin embargo, algunos estudios han demostrado la capacidad de AhR para unirse a regiones del ADN diferentes a las anteriormente citadas llevando igualmente a cabo una modulación transcripcional (Gouédard et al., 2004; Matikainen et al., 2001).

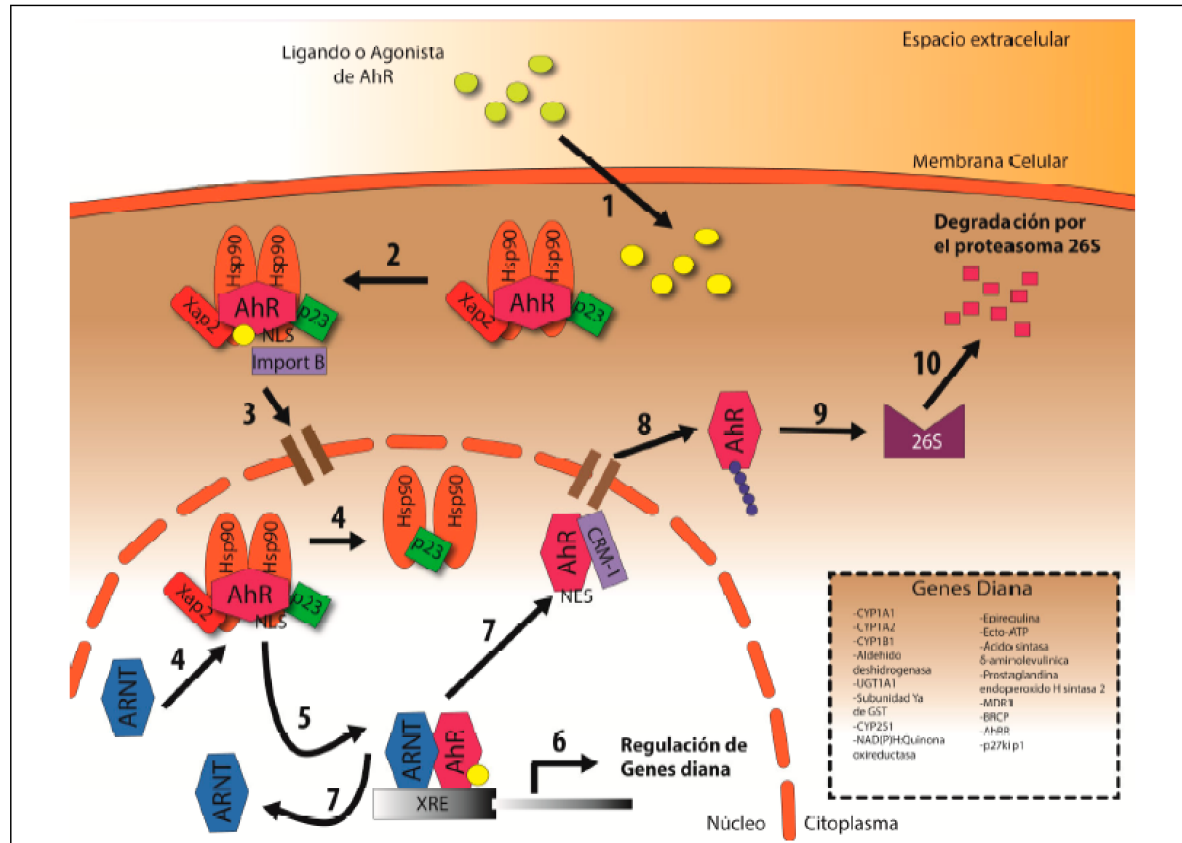


Figura 11. Ruta canónica de señalización del receptor de AhR. En ausencia de ligando, AhR se encuentra chaperonado en el citoplasma. En presencia de un agonista (1), se produce un cambio conformacional en el receptor, permitiendo la exposición de una secuencia de importación nuclear (2), lo que permite al complejo AhR traslocarse al núcleo (3). Una vez en el núcleo, se produce el intercambio del complejo de chaperonas por el factor ARNT (4). El heterodímero AhR/ARNT interacciona con las secuencias consenso XRE en las regiones promotoras de los genes diana (5) promoviendo la transcripción de la batería de genes de AhR (6). Una vez finalizada la señal, AhR se transporta al citoplasma gracias a la exposición de una secuencia de exportación nuclear dependiente de CRM-I (7). Una vez en el citoplasma, AhR es ubiquitinado (8) y finalmente será degradado por el proteasoma 26S (9 y 10). (Adaptado de la tesis doctoral de M^a Isabel Cuartero Desviat).

2.5.4 Función dual de AhR; metabolismo de xenobióticos frente a la función fisiológica

AhR es una proteína cuya estructura se encuentra altamente conservada a lo largo de la evolución (Hahn, 2002; Hahn et al., 2006; Wlaker et al., 2000). Dado que sus ligandos más estudiados, los xenobióticos, son de origen antropogénico, las

funciones originales de AhR tendrían que ser diferentes a aquellos por las cuales se lo conoce hoy. En invertebrados tales como *Caenorhabditis elegans* y *Drosophila melanogaster*, el ortólogo de AhR (*ahr-1* y *spineless*, respectivamente) interacciona con ARNT facilitando la transcripción de genes diana siguiendo el mismo mecanismo molecular que el descrito en vertebrados; sin embargo, carece de capacidad de respuesta a xenobióticos como la dioxina y, en su lugar, promueve diferentes procesos fisiológicos que se describirán más adelante (Butler et al., 2001; Huang et al., 2004; Kim et al., 2006; Qin y Powell-Coffman, 2004), apoyando de este modo la capacidad de AhR para promover funciones fisiológicas independientes del metabolismo de xenobióticos.

2.5.4.1 Expresión de AhR durante el desarrollo y en la etapa adulta

Durante el desarrollo embrionario, la expresión de AhR y la de sus genes diana presenta un patrón espacio-temporal definido (revisión Furness y Whelan, 2009). A lo largo del desarrollo embrionario del ratón, la expresión tanto de AhR como ARNT comienza a detectarse en los estadios E9-E11 en el neuroepitelio, corazón y en la cresta neural derivada de la placoda trigeminal (Abbott et al., 1995; Abbott y Probst, 1995; Jain et al., 1998). Por otro lado, los ARNm de dos de los principales genes diana de AhR, Cyp1a1 y Cyp1b1, comienzan a detectarse en los días E7 y E11 (Choudhary et al., 2003) en diferentes estructuras tales como rombencéfalo, mesencéfalo, corazón y riñones, y en hígado, piel y músculo durante los días E13-E14 (Campbell et al., 2005) (**Figura 12**).

Este patrón espacio-temporal ocurre de manera similar durante el desarrollo embrionario humano en donde además se detecta una alta actividad transcripcional de AhR en pulmones, hígado y glándulas adrenales (Omiecinski et al., 1990).

En el adulto, tanto AhR como sus principales genes diana se expresan de forma constitutiva; sin embargo, tanto su expresión como actividad pueden variar de manera contexto-dependiente.

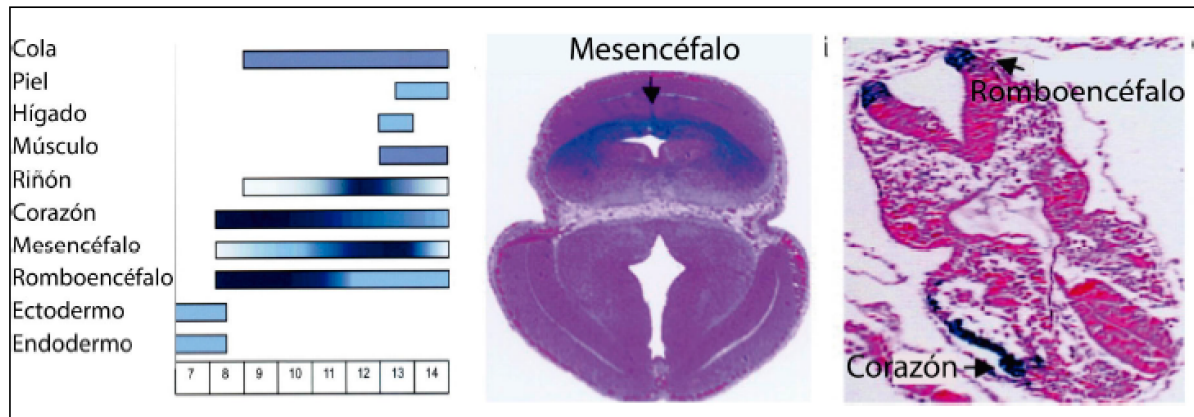


Figura 12. Expresión temporal de LacZ bajo el promotor de Cyp1a1 a lo largo del desarrollo (Figura adaptada de Campbell et al., 2005).

2.5.5 Papel fisiológico de AhR en el sistema nervioso central

Como previamente se explicaba, la mayoría de los estudios que se han realizado sobre AhR tienen que ver con su participación en el metabolismo de xenobióticos y, dada la promiscuidad de su expresión en el organismo, se desconoce con exactitud la función fisiológica de este receptor.

2.5.5.1 Control de la morfología neuronal

En relación con el tejido nervioso, las primeras evidencias que existen sobre el posible papel que este receptor puede desempeñar en el cerebro proceden de invertebrados. Se han encontrado ortólogos de AhR tanto en la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* como en el gusano *Caenorhabditis elegans*. En el caso de *D. melanogaster*, el factor bHLH-PAS denominado *spineless* (ss) se considera el

ortólogo de AhR. En el tejido nervioso de la mosca se distinguen cuatro tipos de neuronas sensoriales atendiendo a su complejidad dendrítica, siendo las neuronas tipo I las más sencillas y las tipo IV las de arborización más compleja (Figura 13). Diversos estudios basados en la pérdida de función de *ss* han puesto de manifiesto su papel esencial en la regulación de la arborización dendrítica neuronal ya que, en este contexto, la ausencia de *ss* resultaba, por un lado, en un incremento en la complejidad dendrítica de las neuronas de tipo I y II y, por otro, en una reducción drástica en las tipo III y IV, sin afectar en ningún caso a alteraciones axonales (Kim et al., 2006).

En el caso de *C. elegans*, *ahr-1* es el homólogo del receptor AhR. *ahr-1* se encuentra expresado en varios de los diferentes subtipos neuronales que configuran el tejido nervioso del gusano (Figura 13). Diversos estudios basados en la pérdida de función de *ahr-1* han demostrado graves defectos relacionados con el desarrollo neuronal como, por ejemplo, alteraciones en las ramificaciones axonales y sobrexceso de crecimiento del árbol dendrítico (Qin et al., 2004).

En el caso de vertebrados mamíferos, recientemente se ha identificado la expresión del ARNm del receptor AhR en el sistema nervioso central tanto durante el desarrollo embrionario y la etapa juvenil como en el adulto, en estructuras como el hipocampo, la corteza cerebral, el cerebelo y el bulbo olfativo (Kimura et al., 2017). Al igual que en invertebrados, diversos estudios apuntan al posible papel de AhR como elemento modulador de la morfología de diferentes tipos neuronales. Así, tras llevar a cabo una activación constitutiva de AhR en las células madre de las paredes de los ventrículos laterales del cerebro, se observó una incapacidad de estas células tanto para alcanzar su destino en los bulbos olfativos y convertirse en neuronas granulares, como para el desarrollo de sus proyecciones dendríticas

(Kimura et al., 2016). Igualmente, la misma estrategia de activación de AhR de manera constitutiva, en las células de la corteza somatosensorial, provocaba alteraciones en los procesos de migración neuronal así como una drástica reducción en su arborización dendrítica, de nuevo sin afectar al componente axonal (Kimura et al., 2017).

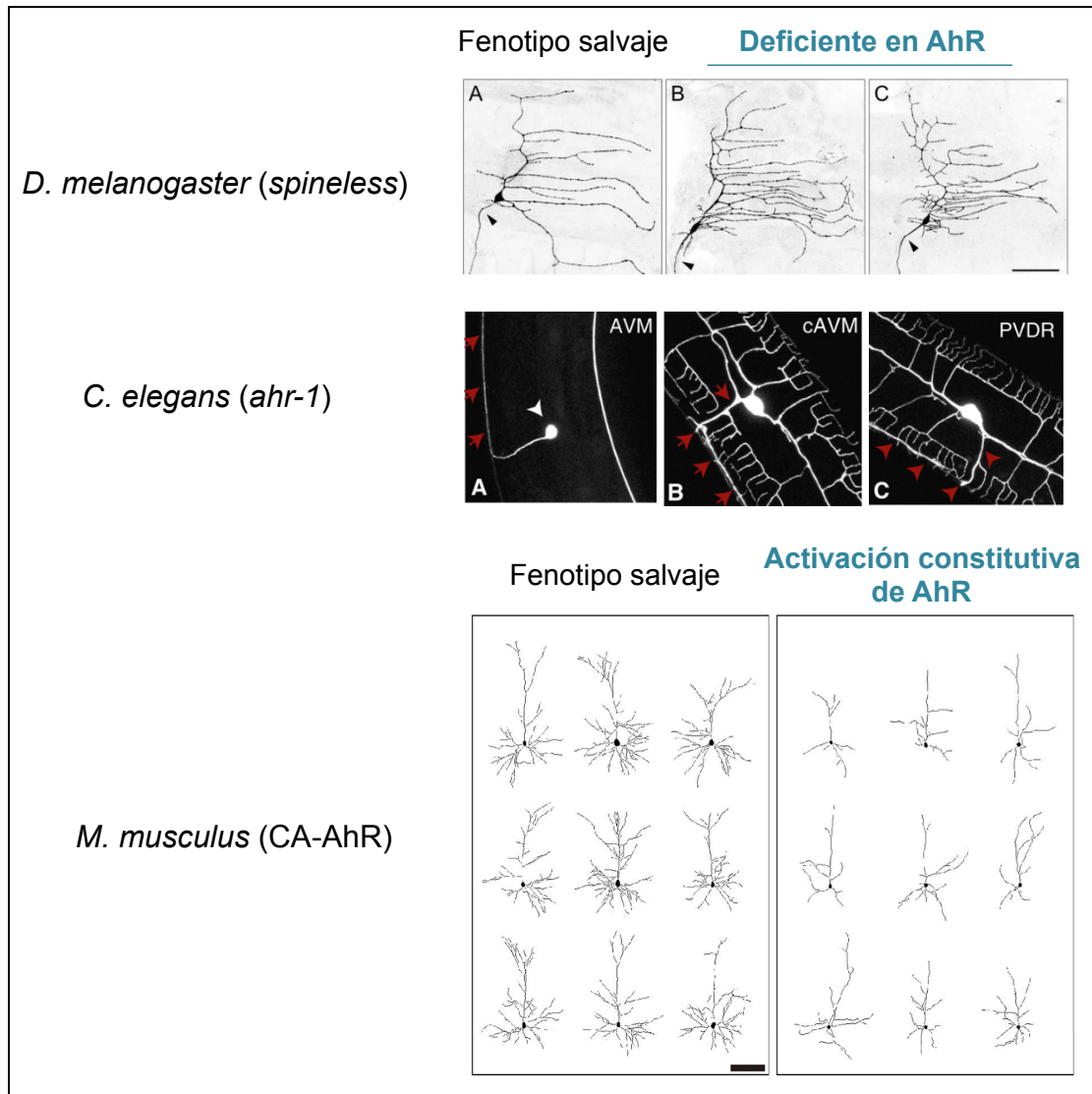


Figura 13. Alteraciones en la morfología neuronal tras la modulación de AhR a lo largo de la filogenia. La ausencia del homólogo de AhR tanto en *D. melanogaster* (*spineless*), como en *C. elegans* (*ahr-1*), potencia el crecimiento del árbol dendrítico neuronal. La sobreexpresión de la forma constitutivamente activa de AhR (CA-AhR) en neuronas piramidales de la corteza cerebral de ratón disminuye su arborización dendrítica. (Figura adaptada de Kim et al., 2006; Smith et al., 2013; Kimura et al., 2017).

2.5.5.2 Modulación de la neurogénesis y función cognitiva

Anteriormente se citaba que el hipocampo es una de las regiones del SNC de mamíferos donde se expresa AhR. Diferentes estudios epidemiológicos y toxicológicos realizados en humanos y animales muestran cómo la activación de AhR por agonistas xenobióticos durante el periodo prenatal da lugar a alteraciones en la capacidad de aprendizaje, en el comportamiento social, así como en enfermedades de tipo psiquiátrico (Nishijo et al., 2007; Patadin et al., 1998; 1999; Piedrafita et al., 2008; Tanida et al., 2013). Dada la estrecha relación entre la neurogénesis hipocampal y estas funciones, el receptor AhR podría estar desarrollando funciones fisiológicas hasta la fecha no bien conocidas. Son pocos los estudios que han intentado abordar el papel fisiológico de AhR en el hipocampo. Así, ante la activación o inhibición del receptor se han visto modificaciones en los niveles de proliferación de determinados progenitores neuronales hipocampales, diferencias en los niveles de activación astrocitaria así como alteraciones cognitivas dependientes del hipocampo (Power et al., 2005; Latchney et al., 2013; Kobayashi et al., 2015). Todo ello pone de manifiesto el papel de AhR como posible regulador de la función cognitiva, posiblemente mediante un papel fisiológico en la neurogénesis hipocampal aunque, sin embargo, por un proceso hasta la fecha desconocido.

3

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 HIPÓTESIS

A partir de los antecedentes, en la presente Tesis Doctoral planteamos las siguientes hipótesis:

1) La remodelación de los circuitos hipocampales tras la respuesta neurogénica inducida por la isquemia cerebral puede ser responsable, al menos en parte, del deterioro cognitivo asociado a esta patología.

2) El receptor de hidrocarburos aromáticos (AhR), puede participar en la neurogénesis y maduración de las neuronas granulares del giro dentado y, consecuentemente, en la memoria dependiente de hipocampo.

3.2 OBJETIVOS BLOQUE 1

Los objetivos planteados para demostrar estas hipótesis son:

3.2.1 Estudio de la función cognitiva tras isquemia cerebral experimental

Para establecer la validez del modelo de ictus basado en la oclusión permanente de la arteria cerebral media de ratón en las alteraciones cognitivas dependientes de hipocampo, propusimos los siguientes subobjetivos:

1. Análisis de la memoria contextual tras isquemia cerebral experimental.
2. Análisis de la memoria espacial tras isquemia cerebral experimental.
3. Análisis de la actividad hipocampal tras isquemia cerebral experimental.

3.2.2 Estudio de la neurogénesis hipocampal tras isquemia cerebral experimental

Para estudiar los cambios en la neurogénesis hipocampal en nuestro modelo de isquemia cerebral experimental y su relación con el deterioro cognitivo, propusimos los siguientes subobjetivos:

1. Estudio de la anatomía hipocampal tras isquemia cerebral: relación con el deterioro cognitivo.
2. Estudio temporal de la neurogénesis hipocampal: relación con el deterioro cognitivo tras isquemia cerebral.

3.2.3 Estudio del deterioro cognitivo después de isquemia cerebral experimental tras sobreestimulación de la neurogénesis hipocampal

Para explorar la contribución del aumento de la neurogénesis hipocampal en el deterioro cognitivo post-ictus, establecimos los siguientes subobjetivos:

1. Efecto del aumento de neurogénesis hipocampal inducido por ejercicio físico voluntario sobre el deterioro cognitivo tras isquemia cerebral experimental.
2. Efecto del aumento de neurogénesis hipocampal inducido por estimulación farmacológica sobre el deterioro cognitivo tras isquemia cerebral experimental.

3.2.4 Estudio de la remodelación de los circuitos hipocampales tras isquemia cerebral

Para estudiar si el aumento de neurogénesis causado por la isquemia está asociado a alteraciones en los circuitos hipocampales, establecimos los siguientes subobjetivos:

1. Análisis de la remodelación diferencial de los circuitos hipocampales tras isquemia cerebral: estudio en nuevas neuronas inmaduras.
2. Análisis de la remodelación diferencial de los circuitos hipocampales tras isquemia cerebral: estudio en nuevas neuronas maduras.

3.2.5 Estudio de la inhibición de la neurogénesis hipocampal tras isquemia cerebral y su papel en el deterioro cognitivo

Para demostrar el papel del aumento neurogénico post-ictus en el deterioro cognitivo, establecimos los siguientes subobjetivos:

1. Efecto de la inhibición farmacológica de la neurogénesis post-ictus sobre la función cognitiva tras isquemia
2. Efecto de la inhibición de la neurogénesis post-ictus a través de un modelo genético sobre la función cognitiva tras isquemia

3.3 OBJETIVOS BLOQUE 2

3.3.1 Estudio del papel del receptor AhR en la memoria hipocampal

Para determinar el papel del receptor AhR en la función hipocampal y, más específicamente, en la memoria dependiente de esta estructura, propusimos los siguientes subobjetivos:

1. Estudio de la memoria contextual en ausencia de AhR.
2. Estudio de la discriminación de patrones en ausencia de AhR.
3. Estudio de la memoria espacial en ausencia de AhR.

3.3.2 Estudio del papel de AhR en la neurogénesis hipocampal

Para explorar si los defectos en la memoria hipocampal en ausencia de AhR son concomitantes a las alteraciones en la neurogénesis en esta estructura, establecimos los siguientes subobjetivos:

1. Análisis de la proliferación hipocampal en ausencia de AhR.
2. Estudio del nicho neurogénico hipocampal en ausencia de AhR.
3. Análisis de la generación de nuevas neuronas hipocampales en ausencia de AhR.
4. Análisis de la neurogénesis en la zona subventricular en ausencia de AhR.

3.3.3 Estudio del papel de AhR en la morfología de las neuronas granulares hipocampales

Para explorar si los defectos en la memoria hipocampal en ausencia de AhR son paralelos a alteraciones en la morfología de las neuronas granulares del giro dentado, propusimos los siguientes subobjetivos:

1. Análisis morfológicos de las neuronas granulares en ausencia de AhR.
2. Análisis morfológicos de las nuevas neuronas granulares en ausencia de AhR.

3.3.4 Estudio del papel de AhR en las propiedades electrofisiológicas en las neuronas granulares hipocampales

Para explorar si los defectos en la memoria hipocampal en ausencia de AhR son concomitantes a alteraciones en las propiedades electrofisiológicas de las neuronas granulares del giro dentado, establecimos los siguientes subobjetivos:

1. Análisis de la excitabilidad intrínseca en las neuronas granulares en ausencia de AhR.
2. Análisis en la maduración sináptica en las neuronas granulares en ausencia de AhR.
3. Análisis de la circuitería hipocampal en ausencia de AhR.

3.3.5 Estudio del papel de AhR en la neurogénesis y en la memoria dependiente de hipocampo tras su delección específica en los progenitores neuronales

Para determinar si la ausencia específica de AhR en los progenitores hipocampales es responsable de las alteraciones en neurogénesis y cambios morfológicos en las neuronas granulares del giro dentado, propusimos los siguientes subobjetivos:

1. Generación de animales con delección específica de AhR en los progenitores neuronales hipocampales.
2. Análisis de la neurogénesis y morfología de las nuevas neuronas tras la delección específica de AhR en los progenitores neuronales.
3. Estudio de la memoria dependiente de hipocampo tras la delección específica de AhR en los progenitores neuronales.

4

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 TÉCNICAS EXPERIMENTALES *IN VIVO*

4.1.1 Normativa y animales de experimentación

Todos los protocolos experimentales se rigieron bajo las guías de experimentación animal del Comité de Experimentación Animal de la Universidad Complutense de Madrid (directivas de la UE 86/609/CEE, 2003/65/CE y española RD53/2013). Los animales se alojaron en condiciones libres de patógenos específicos (SPF) en el animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense y en el animalario del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), y se mantuvieron bajo un régimen de 12 horas de luz y 12 de oscuridad, con agua y comida disponible *ad libitum*.

En el primer bloque de este trabajo se emplearon las siguientes líneas de ratones:

Nombre	Cepa	Fenotipo	Referencias
WT	C57BL/6	Animales WT	
NestinaCre ^{ERT2}	C57BL/6	Recombinasa Cre inducible tras la activación del Receptor de Estrógenos 2 por 4-OH-tamoxifeno bajo el control del promotor del gen <i>nestina</i>	(Imayoshi et al., 2006)
Eno2-STOP-ATD	C57BL/6	Gen <i>atd</i> (fragmento A de la toxina de la difteria) interrumpido por una secuencia STOP bajo el promotor de la <i>enolasa 2</i> específica de neuronas	(Imayoshi et al., 2008)
NestinaCre ^{ERT2} ₋ NSE/ATD	C57BL/6	Gen ATD expresado en las células Nestina ⁺ tras la inducción por 4-OH-tamoxifeno	(Sakamoto et al., 2011)

Tabla 4. Líneas de animales salvajes y transgénicos empleados en el primer bloque de resultados.

Todos los experimentos se llevaron a cabo en ratones machos con fondo genético C57BL/6 de 8 a 12 semanas de edad. Los ratones WT fueron obtenidos de los laboratorios Harlan. Los ratones NestinaCre^{ERT2} se consiguieron gracias a la colaboración con el profesor Itaru Imayoshi de la Universidad de Kyoto (Japón). Bajo el promotor del gen *nestina*, estos ratones expresan la proteína CRE recombinasa fusionada al receptor 2 de estrógenos (ERT2) (Tabla 4). Solo ante la presencia 4-OH-tamoxifeno el ERT2 convertirá la CRE recombinasa en su forma activa. Los ratones Eno2-STOP-ATD se consiguieron gracias a la colaboración con el profesor Shigeyoshi Itohara del *Riken Brain Science Institute* (Japón). Bajo el promotor específico neuronal *enolasa 2*, estos ratones tienen insertado el gen del fragmento A de la toxina de la difteria precedido por una secuencia STOP (Tabla

4). Los ratones NestinaCre^{ERT2} se cruzaron con los Eno2-STOP-ATD, generando un doble mutante NestinaCre^{ERT2}-NSE/ATD (Tabla 4). En estos ratones, la CRE recombinasa inducible por tamoxifeno permite la expresión de la ATD bajo el promotor Eno2 en neuronas en proceso de maduración, produciendo una drástica eliminación de las nuevas neuronas generadas en la ZSG del hipocampo vía apoptosis. Como controles, se utilizaron los animales tanto NestinaCre^{ERT2}, NestinaCre^{ERT2}-NSE/ATD tratados con tamoxifeno o vehículo.

En el segundo bloque de este trabajo se emplearon las siguientes líneas de ratones:

Nombre	Cepa	Fenotipo	Referencias
WT	C57BL/6	Animales WT	
AhR KO	C57BL/6	Animales con la proteína AhR no funcional	
NestinaCre ^{ERT2}	C57BL/6	Recombinasa CRE inducible tras la activación del Receptor de Estrógenos 2 por 4-OH-tamoxifeno bajo el control del promotor del gen <i>nestina</i>	(Imayoshi et al., 2006)
AhR ^{ff}	C57BL/6	Exón 2 del gen <i>ahr</i> flanqueado por secuencias loxP	(Walisser et al., 2005)
NestinaCre ^{ERT2} - AhR ^{ff}	C57BL/6	Deleción inducible del gen <i>ahr</i> en las células nestina ⁺ por la activación de 4-OH-tamoxifeno	

Tabla 5. Líneas de animales salvajes y transgénicos empleados en el segundo bloque de resultados.

Todos los experimentos se llevaron a cabo en ratones machos con fondo genético C57BL/6 de 4 a 14 semanas de edad. Los ratones WT y AhR KO ($AhR^{-/-}$) se obtuvieron de los laboratorios Taconic. Estos ratones presentan delecionado el exón 3 del gen *ahr* que da lugar a una proteína no funcional (Tabla 5).

Los ratones AhR^{ff} se obtuvieron de *Jackson Laboratory* (Bra Harbor, Me. EE.UU.). Estos ratones presentan el exón 2 del gen *ahr* flanqueado por secuencias loxP (Tabla 5).

Los ratones $NestinaCre^{ERT2}$ se cruzaron con los AhR^{ff} , generando una primera generación (F1) doble mutante $NestinaCre^{ERT2}-AhR^{f/+}$. Los animales resultantes de esta F1 se cruzaron entre sí para obtener una segunda generación (F2) doble mutante $NestinaCre^{ERT2}-AhR^{ff}$. En estos ratones, la CRE recombinasa inducible por tamoxifeno produce la expresión no funcional del gen *ahr* en las nuevas neuronas generadas en la ZSG del hipocampo. Los animales con genotipos $NestinaCre^{ERT2 (-)}-AhR^{ff}$ resultantes de estos cruces tratados con tamoxifeno se emplearon como grupo control (Tabla 5).

El genotipado de los ratones se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, *polymerase chain reaction*) empleando ADN genómico junto con los correspondientes cebadores (Tabla 6). La extracción del ADN genómico se realizó mediante la digestión enzimática de una biopsia de la cola en tampón de lisis (NaCl 100 mM, EDTA 10 mM, SDS 0,5% y Tris 10 mM pH 8) con proteinasa K (0,1 mg/ml) durante 16h a 55°C, seguido de extracción con fenol/cloroformo/isoamilo y precipitación con etanol y acetato de sodio. Finalmente, el ADN se dejó secar y se resuspendió en 100 µl de tampón TE (EDTA 10 mM y

Tris 10 mM pH 8), de los cuales se emplearon 2 µl (150-300 ng de ADN genómico) como molde para la PCR.

Gen	Tipo de iniciador	Secuencia
NestinaCre ^{ERT2}	<i>Forward</i>	TTCCGCTGGGTCACTGTGCGCCGCTAC
	<i>Reverse</i>	TAATCGCGAACATCTTCAGGTTCTGC
Eno2-STOP-ATD	<i>Forward</i>	AATTCTTAATTAAGGCGCGCCGG
	<i>Reverse</i>	GTCAGAATTGAGGAAGAGCTGGGG
	<i>Middle</i>	CACTGAGGATTCTTCTGTGG
LC3 (control interno)	<i>Forward</i>	GTTAGCATTGAGCTGCAAGCGCCGTCT
	<i>Reverse</i>	TGAGCGAGCTCATCAAGATAATCAGGT
AhR ^{trf}	<i>Forward</i>	CAG TGG GAA TAA GGC AAG AGT GA
	<i>Reverse</i>	GGT ACA AGT GCA CAT GCC TGC

Tabla 6. Lista de cebadores empleados para los genotipados de las diferentes líneas de ratones transgénicos.

4.1.2 Modelo de isquemia experimental por oclusión permanente de la arteria cerebral media (pMCAO)

El modelo de isquemia cerebral utilizado en esta tesis doctoral consiste en la oclusión permanente de la arteria carótida común (ACC) y de la arteria cerebral media (ACM) izquierdas mediante ligadura (*permanent middle cerebral artery occlusion*, pMCAO) (**Figura 14**). Este procedimiento quirúrgico es una variante del modelo descrito por Chen y colaboradores (Chen et al., 1986). La elección del

modelo permanente se ha realizado en base a su relevancia clínica en comparación con los modelos experimentales de oclusión mecánica transitoria (revisiones de Hossmann, 2009, 2012).

Para este procedimiento, los animales se introdujeron en una cámara de inducción de anestesia con una mezcla de oxígeno/aire comprimido (0,2/0,8L/min) e isoflurano al 1,5-2% durante 5 minutos. Durante el proceso quirúrgico, la anestesia se mantuvo al 1,5-2% de isoflurano y con igual mezcla de oxígeno/aire comprimido. La temperatura corporal se controló con una sonda de temperatura rectal, y se mantuvo a $36,5 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ usando una manta emisora de calor sobre la cual reposa el animal.

La ligadura de la ACC izquierda se llevó a cabo mediante una incisión en la línea media cervical, para proceder a continuación a la disección y ligadura de la arteria utilizando una seda 6/0. Posteriormente, se realizó una incisión desde el canto lateral del ojo izquierdo y el canal auditivo externo para exponer y retraer el músculo temporal. Tras una pequeña craneotomía (2mm) a nivel del tronco de la ACM izquierda y sobre la fisura rinal, se expuso dicha dicha arteria. A continuación se procedió a realizar una ligadura permanente a nivel del tronco en su región distal, justo antes de su bifurcación en las ramas frontal y parietal, empleando una sutura monofilamento de 9/0 (Nylon, S&T). La interrupción del flujo sanguíneo se confirmó bajo el microscopio quirúrgico (WILD M650). Este tipo de oclusión da lugar a infartos corticales que afectan principalmente a la corteza somatosensorial.

Para el grupo sham, los animales se sometieron a la anestesia y al procedimiento quirúrgico pero sin llevarse a cabo la oclusión de la ACC y ACM.

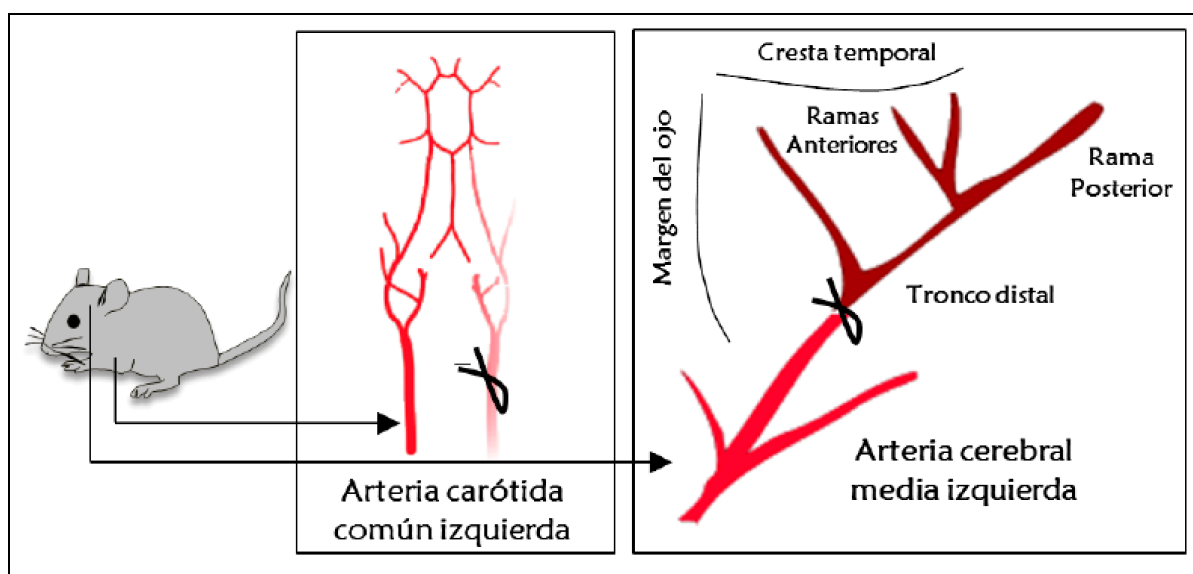


Figura 14. Modelo de la oclusión permanente de la arteria cerebral media mediante ligadura en ratón (MCAO). Estructura de la arteria carótida y la arteria cerebral media en su región proximal.

4.1.3 Evaluación volumétrica de la corteza infartada, hipocampo y giro dentado

4.1.3.1 Tinción histológica de Nissl mediante violeta de cresilo

Para la evaluación volumétrica de la corteza infartada, del hipocampo y del giro dentado hipocampal mediante la tinción histológica de Nissl se emplearon 12 secciones coronales de cerebro de ratón con una fracción de muestreo de 1/5 (secciones de 30 μ m, distancia de 600 μ m), que incluyen desde bregma +1,78mm a bregma -3,64mm (corteza) y desde bregma -1,46mm a bregma -2,3mm (hipocampo y giro dentado). Estas secciones se montaron en portaobjetos Superfrost (Thermo Scientific), se secaron, se hidrataron con agua destilada y se tiñeron mediante una solución de acetato de violeta de cresilo (Sigma Aldrich) al 0,5%. Una vez teñidas, las muestras se sometieron para su deshidratación a una gradación creciente de alcoholes (75, 90 y 100% etanol), posteriormente se sumergieron en xileno (Sigma

Aldrich) y finalmente con montaron en medio de montaje DPX (Sigma Aldrich). La tinción de Nissl permite la visualización del infarto tras el modelo pMCAO como un área hipocromática en la corteza ipsilateral, indicativa del daño tisular. El análisis en detalle permite de manera adicional la visualización de cambios morfológicos celulares, como la disminución de tamaño, la condensación nuclear y un aspecto triangular en comparación con la corteza contralateral.

Tanto la medida del volumen de infarto como la del hipocampo y del giro dentado hipocampal se realizó mediante la estimación por Cavalieri (Michel y Cruz-Orive, 1988), utilizando un microscopio óptico (Nikon Eclipse 80i Nikon Corporation) acoplado al software StereoInvestigator 6 (MicroBrightfield Inc.). La estimación de los volúmenes se realizó con un coeficiente de error medio para la estimación menor de 0,05 (Gundersen, m=0,01). El tamaño del *grid* empleado para el cálculo del volumen del hipocampo y del giro dentado fue de 100 y 20 μm^2 , respectivamente.

El % de hemisferio infartado se calculó según la siguiente fórmula: %HI (porcentaje de hemisferio infartado)

$$\% \text{ HI} = \text{Volinf} / \text{Volcontr} * 100$$

Donde:

$$\text{Volinf (volumen de infarto)} = \sum \text{InfArea}_i / \text{Índice de edema}_i$$

$$\text{VolContrArea (volumen de ContrArea)} = \sum \text{A}_{\text{ContrArea}}$$

$$\text{Índice de edema}_i = \text{IpsArea} / \text{ContrArea}$$

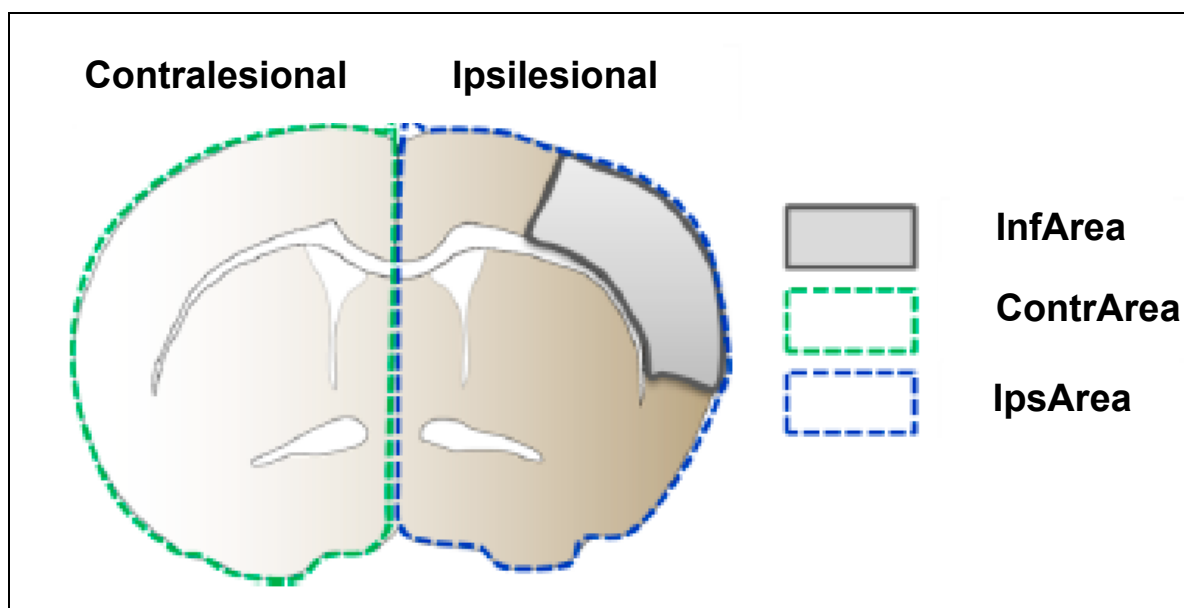


Figura 15. Medidas empleadas en el cálculo del volumen de infarto expresado como % de hemisferio infartado. La división del área infartada por el índice de edema solo se lleva a cabo si dicho índice es mayor que 1.

4.1.3.2 Resonancia magnética

La determinación temprana del volumen de infarto (24-48h después de la cirugía) se llevó a cabo mediante estudios de imagen por resonancia magnética (MRI). Para dichos análisis, se empleó el equipo Biospec BMT 47/40 (Bruker, Ettlingen, Germany) con un campo de 4,7T, que permite la obtención de imágenes de resonancia magnética *in vivo*. Mediante el *software* de imagen ParaVision, se llevó a cabo la adquisición y reconstrucción de imágenes y el procesamiento de los datos obtenidos. Posteriormente, utilizamos el *software* Fiji (NIH, EE.UU), para determinar los volúmenes de hemisferio infartado en los diferentes grupos a partir de las imágenes en T2.

Con un observador “ciego” a las condiciones experimentales, se calcularon las áreas de tejido infartado (InfArea), el hemisferio ipsilesional entero (IpsArea) y el contralesional entero (ContrArea) para cada sección. Después, se calculó el porcentaje de hemisferio infartado (%HI) (Hernández-Jiménez et al., 2013) (**Figura 15**) usando la fórmula: $\%HI = InfVol/ContrVol \times 100$ donde InfVol (Volumen de tejido infartado) = $\sum InfArea_i / \text{Índice de edema}_i$, ContrVol (Volumen de hemisferio contralesional) = $\sum ContrArea_i$ e Índice de edema_i = $IpsArea_i / ContrArea_i$.

Para dichas medidas empleamos 17 cortes separados 450 µm entre sí desde bregma +1,78mm a bregma -3,64mm. La conversión de las medidas obtenidas con el *MRI analysis calculator* a unidades de volumen (mm³) para su introducción en la fórmula de % *Hemisferio Infartado* se consiguió aplicando las siguientes fórmulas:

$$\text{Resolución en el Plano} = \text{Vol MRI analysis calculator} \times 0,098 \times 0,098$$

$$\text{Resolución en Volumen} = \text{Resolución en el Plano} \times 0,391$$

$$\text{Volumen de Infarto} = \text{Suma de volúmenes}$$

4.1.4 Evaluación de la función cognitiva

4.1.4.1 Condicionamiento al miedo contextual (CMC)

El **test de evaluación del condicionamiento al miedo contextual** es uno de los procedimientos de condicionamiento más utilizado para estudiar la memoria de un animal (**Figura 16**). Consiste en introducir al animal en un contexto nuevo y devolverle a su entorno habitual tras someterle a un estímulo aversivo (generalmente un *shock* eléctrico). Cuando el animal es introducido de nuevo en

este contexto, en el caso de que haya sido capaz de asociar dicho contexto con el estímulo aversivo, generalmente muestra una respuesta de “congelación”, que se define como una ausencia de movimientos excepto el producido por la propia respiración (Methods of Behavior Analysis in Neuroscience, Browman, CRC Press/Taylor & Francias, 2009).

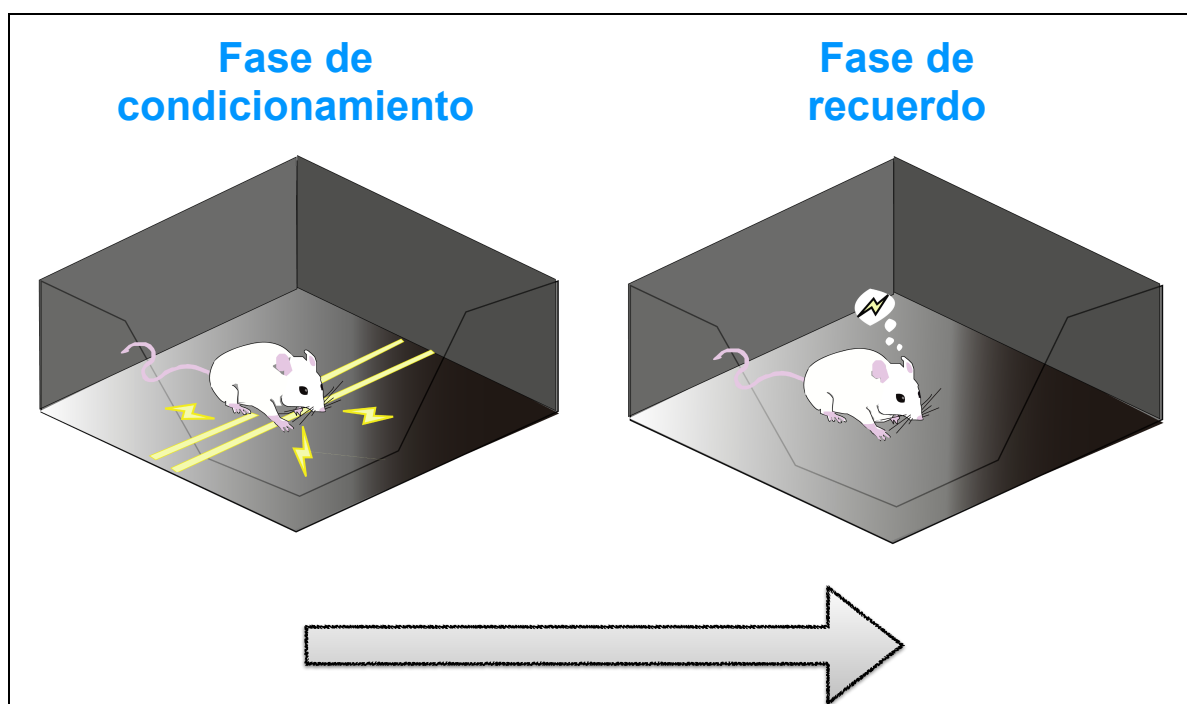


Figura 16. Paradigma del test del condicionamiento al miedo contextual. Durante la fase de condicionamiento, los animales asocian el nuevo contexto con el estímulo aversivo (*shock* eléctrico). Durante la fase de recuerdo, los animales muestran una respuesta de “congelación” al recordar el estímulo aversivo tras reintroducirllos en el mismo contexto de la fase de condicionamiento.

El CMC se realizó en un dispositivo (AM1000 Avoidance Station, Kinder Scientific, EE.UU.) que cuenta con dos cajas de comportamiento (31cm x 24cm x 21cm) y cuyo suelo está constituido por barras conductoras de electricidad (3.2mm de diámetro separadas por 7.9mm). Como protocolo general, durante la fase de condicionamiento, los animales se colocaron en las jaulas y, tras 150s de aclimatación, recibieron 3 descargas eléctricas (0.6mA, duración 2s, separados por 1min). Un minuto después de recibir la última descarga, los animales se

devolvieron a sus jaulas habituales. Para determinados experimentos, se emplearon protocolos de condicionamiento débil (0.4mA x1, duración 2s) y fuerte (0.8mA x5, duración 2s, separados por 1min). Para analizar la capacidad de recuerdo, los animales se reintrodujeron durante 5 min en la jaula donde recibieron los estímulos aversivos. Entre cada animal se utilizó etanol 70% para eliminar olores y restos orgánicos. Durante esta fase se llevó a cabo la grabación del comportamiento de los animales mediante cámaras de video. Mediante un sistema automatizado se llevó a cabo la cuantificación de la respuesta de congelación, la actividad, la inactividad y el acicalamiento de los animales.

4.1.4.2 Condicionamiento al miedo contextual de tipo incidental

El protocolo de aprendizaje se llevó a cabo en el dispositivo descrito arriba. Durante la fase de pre-exposición (7 días después de la cirugía), los animales se introdujeron en la caja de comportamiento durante 10 minutos. Veintiocho días después, los animales se reintrodujeron en la caja e, inmediatamente, recibieron un único *shock* eléctrico (≤ 1 s tras introducir al animal en la caja, 1 mA, 2 s de duración), y los ratones se devolvieron a sus jaulas 1 min después. Durante la fase de recuerdo (24h después), los animales se introdujeron en la jaula durante 5 min.

4.1.4.3 Laberinto de Barnes

El **laberinto de Barnes** es un test empleado para estudiar la memoria espacial en roedores. El test consiste en una plataforma circular elevada 70 cm sobre el suelo (100cm de diámetro) con 20 agujeros equidistantes unos de otros situados alrededor del perímetro (**Figura 17**).

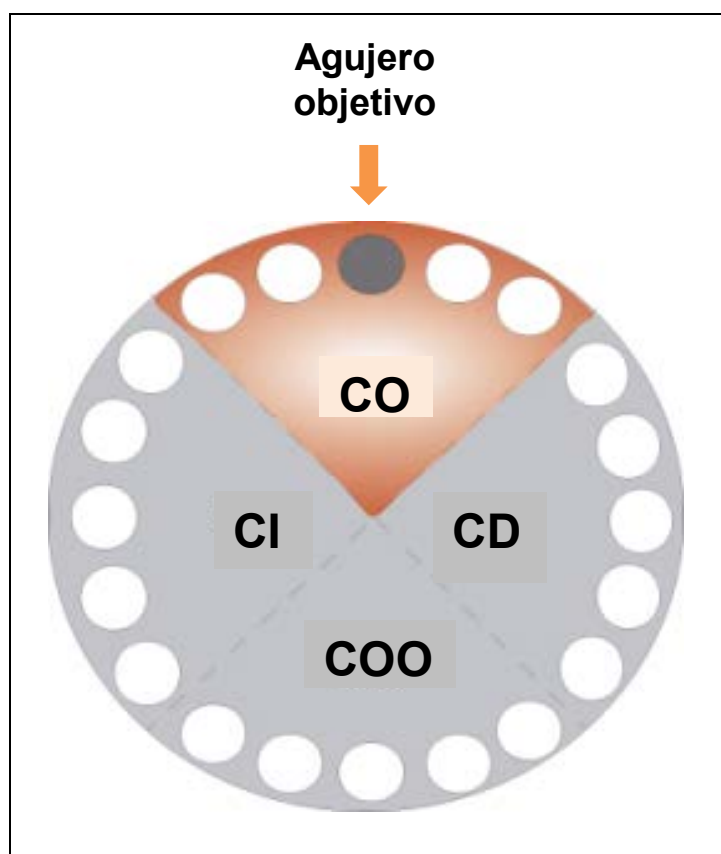


Figura 17. Plataforma del laberinto de Barnes. En la figura se representa el agujero objetivo junto con los diferentes cuadrantes: CO: Cuadrante objetivo; CD: cuadrante derecho; CI: cuadrante izquierdo; COO: cuadrante opuesto al objetivo.

Durante la fase de habituación, se permitió a los animales explorar libremente la plataforma durante 5 min. Durante la fase de entrenamiento (3 veces al día durante 7 días consecutivos), se colocó una caja de escape de color negro (17 x 13 x 7cm) debajo de uno de los agujeros, permitiendo al animal escapar de la plataforma. Igualmente, durante esta fase, se colocaron diferentes señales (de diferentes formas y colores) en las paredes de la habitación donde se llevó a cabo el test, permitiendo al animal identificar la localización de la caja de escape según la disposición de las diferentes pistas. En cada uno de los entrenamientos, los animales se colocaron en el centro de la plataforma y durante 10 min se les permitió explorar hasta que entraran en la caja de escape, donde permanecían 30

segundos antes de ser devueltos a su caja. Si durante esos 10 min los animales no conseguían entrar en la caja de escape, eran guiados por el investigador. Durante la fase de recuerdo, se volvieron a colocar a los animales en la plataforma y se les permitió explorar durante 5min, en ausencia de caja de escape. Entre cada animal se utilizó etanol 70% para eliminar olores y restos orgánicos. Se llevó a cabo la grabación por video de la fase de entrenamiento y la de recuerdo. A través del software *Ethowatcher*, determinamos los diferentes parámetros comportamentales de los animales, tales como la velocidad, la actividad exploratoria horizontal, y vertical, el acicalamiento y el tiempo que pasaban en cada cuadrante y agujero del laberinto.

4.1.4.4 Test del reconocimiento del objeto nuevo (RON) y nueva localización del objeto (NLO)

Dada la alta capacidad exploratoria característica de los roedores se emplearon los [test del reconocimiento del objeto nuevo \(RON\)](#) así como el [test de la nueva localización del objeto \(NLO\)](#) para estudiar la memoria de los animales ([Figura 18](#)).

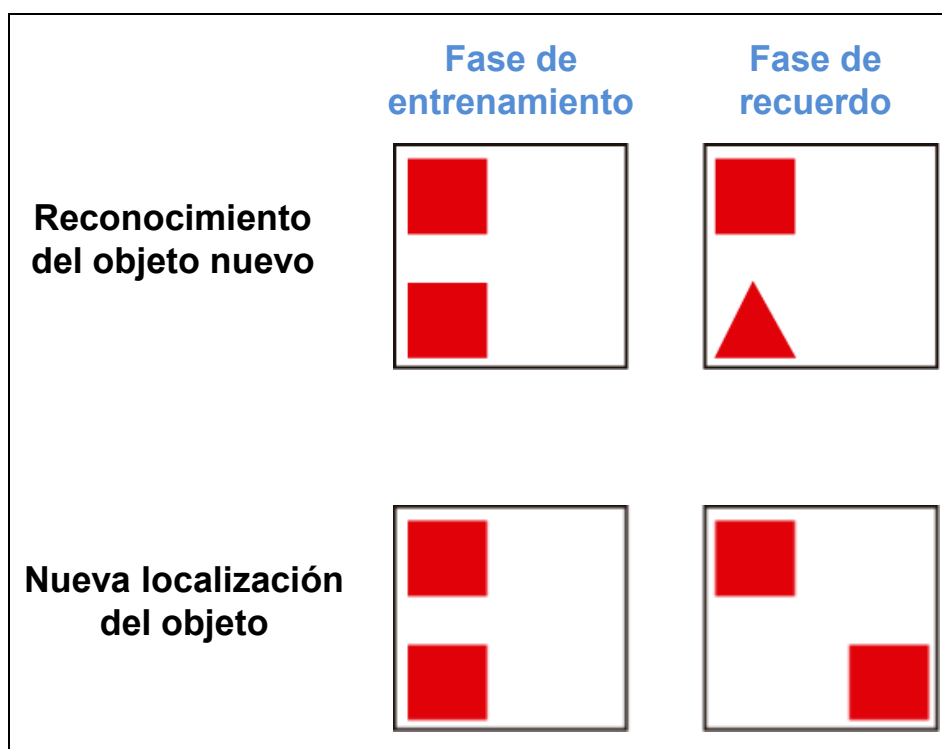


Figura 18. Paradigma de los tests del reconocimiento del objeto nuevo (RON) y de la nueva localización del objeto (NLO). En la figura se representan tanto la fase de entrenamiento como la de recuerdo para cada uno de los tests.

Tanto el RON como NLO se llevaron a cabo en un dispositivo rectangular (50cm x 20cm x 30cm). La base de dicho dispositivo estaba recubierta del serrín empleado para recubrir las jaulas de los animales y sus paredes son opacas, impidiendo de este modo al animal observar lo que ocurre fuera del dispositivo. Durante la fase de entrenamiento de ambos tests, se le permitía al animal explorar dos objetos idénticos colocados sobre el serrín del dispositivo (15cm de distancia entre sí) durante 8 minutos. Pasado este tiempo, los animales se devolvieron a sus jaulas. El estudio de la capacidad de retención de los animales se llevó a cabo 6 horas tras la fase de entrenamiento. Durante la fase de retención del RON, se evaluó la capacidad de los animales para identificar el intercambio de uno de los objetos originales por un objeto nuevo diferente durante 8 minutos. Para ello, se analizó el tiempo empleado por el animal en explorar cada uno de los objetos.

Durante la fase de retención del NOL, se evaluó la capacidad de los animales para identificar el cambio de localización en el dispositivo de uno de los dos objetos presentes durante la fase de entrenamiento durante 8 minutos. Para ello se analizó el tiempo empleado por el animal en explorar cada uno de los objetos. Entre cada animal se utilizó etanol 70% para eliminar olores y restos orgánicos. En ambos tests, el tiempo empleado en explorar cada uno de los objetos se expresó como porcentaje de tiempo de exploración siguiendo la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Tiempo exploración} = (\text{Tiempo objeto}) / (\text{Tiempo objeto nuevo} + \text{Tiempo objeto familiar})$$

Durante la fase de retención se llevó a cabo la grabación mediante video del comportamiento de los animales.

4.1.4.5 Laberinto en Y

El [test del laberinto en Y](#) se utilizó para analizar la memoria de trabajo y espacial de los animales. El test se llevó a cabo mediante el empleo de un laberinto constituido por tres brazos idénticos (35cm de largo, 5cm de ancho y 10cm de alto) unidos en una configuración de Y ([Figura 19](#)).

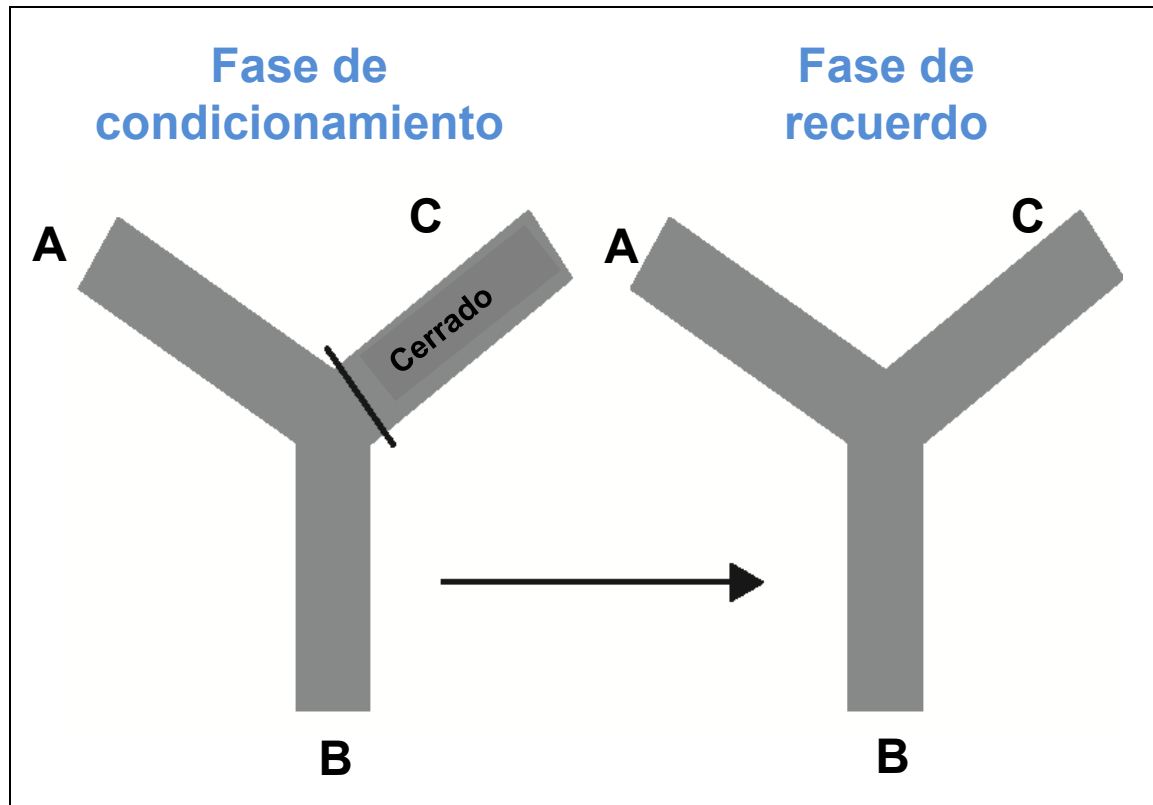


Figura 19. Paradigma del test laberinto en Y. En la figura se representa tanto la fase de entrenamiento como la de recuerdo.

Para estudiar la memoria de trabajo, los animales se colocaron inicialmente en el punto donde cruzan los tres brazos y se les permitió explorar libremente cada uno de ellos durante 8 minutos. Al final de cada brazo se colocaron unas señales de diferentes características (forma/color) que permitían la identificación diferencial de cada uno de los brazos. El criterio utilizado como “entrada” en cada brazo se estableció como la introducción al menos de ambas patas delanteras en cada uno de los brazos. Entre cada animal se utilizó etanol 70% para eliminar olores y restos orgánicos. Durante esta fase se grabó el comportamiento de los animales y posteriormente se analizó el porcentaje de alternancias, siguiendo la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Alternancias} = (\text{Número de Triadas} / \text{Posibles alternancias totales}) \times 100$$

Triadas = entrada en los tres brazos diferentes de manera consecutiva sin repetir la entrada en alguno de ellos

Para evaluar la memoria espacial, durante la fase de entrenamiento se permitió a los animales explorar libremente solo 2 de los 3 brazos del laberinto en Y durante 8 minutos durante los cuales 1 de los brazos se bloqueó impidiendo la exploración del mismo. Seis horas más tarde, en la fase de retención, los animales se reintrodujeron en el laberinto con los 3 brazos disponibles y se les permitió explorar cada uno de ellos durante 8 minutos. Entre cada animal se utilizó etanol 70% para eliminar olores y restos orgánicos. Durante esta fase se llevó a cabo la grabación del comportamiento y se analizó el número de entradas en cada uno de los brazos, así como el tiempo que pasaban en cada uno de los brazos.

4.1.5 Tratamientos

4.1.5.1 Ejercicio físico voluntario

Para determinados experimentos se les permitió a los animales realizar ejercicio físico basado en correr de manera voluntaria. Para ello, 7 días después de la isquemia cerebral y 24 horas después del correspondiente entrenamiento, se introdujeron dos ruedas de correr en las jaulas de los animales en los grupos denominados “corredores” (3 animales por jaula). En los grupos control, denominados “sedentarios”, igualmente se introdujeron dos ruedas, pero éstas permanecieron bloqueadas durante todo el experimento. Las ruedas se mantuvieron hasta la finalización del experimento.

4.1.5.2 Tratamiento con 4-OH-Tamoxifeno

La activación de la enzima CRE recombinasa en los animales Nestina-Cre^{ERT2}/NSE-ATD se llevó a cabo mediante una inyección intraperitoneal diaria de 4-OH-Tamoxifeno (150mg/Kg) (Sigma Aldrich) disuelto en aceite de girasol durante 5 días. En el grupo control, a los animales Nestina-Cre^{ERT2}/NSE-ATD se les administró el correspondiente vehículo. El tratamiento comenzó 7 días después de la isquemia cerebral y 24 horas después del correspondiente entrenamiento. Con el objetivo de maximizar los efectos de la recombinación, los animales Nestina-Cre^{ERT2}/AhR^{flox/flox}, recibieron dos rondas de inyecciones intraperitoneales diarias de 4-OH-Tamoxifeno (180mg/Kg) durante 5 días. La primera y segunda ronda se administró en los días 30 y 60 postnatales (Cancino et al., 2013). Los animales del grupo control (AhR^{flox/flox}) recibieron únicamente inyecciones de aceite de girasol siguiendo el mismo protocolo de administración.

4.1.5.3 Tratamiento con bromodesoxiuridina (BrdU)

Para los diferentes protocolos de administración, se disolvió la BrdU en buffer fosfato-salino (BFS). Para el estudio del número de nuevas neuronas generadas e integradas en el giro dentado mediante la colocalización de BrdU con el marcador neuronal calbindina 65 y 28 días después del inicio del tratamiento, se llevaron a cabo 2 rondas de inyecciones intraperitoneales diarias (100mg/Kg) durante 5 días (separadas 1 semana entre sí) comenzando 10 días después de la isquemia cerebral, o una única ronda de 5 inyecciones diarias (100mg/Kg), respectivamente.

Para el estudio de la caracterización de los diferentes progenitores de la ZSG en estado de reposo y en estado proliferativo se llevaron a cabo 4 inyecciones intraperitoneales de BrdU (150mg/Kg) cada dos horas. 24 horas tras la última

inyección, se sacrificaron los animales para los correspondientes estudios por citometría de flujo e histológicos.

4.1.5.4 Tratamiento con memantina (MEM)

El fármaco memantina se preparó al 0,9% en buffer fosfato salino (BFS). El tratamiento consistió en una inyección intraperitoneal por semana (25mg/Kg) durante 4 semanas. El tratamiento comenzó 7 días después de la isquemia cerebral y 24 horas después del correspondiente entrenamiento.

4.1.5.5 Tratamiento con temozolomida (TMZ)

El fármaco temozolomida se preparó a una concentración de 0,9% en buffer fosfato salino y 10% DMSO. El tratamiento consistió en una inyección intraperitoneal diaria (25mg/Kg) durante 4 días consecutivos durante 4 semanas. El tratamiento comenzó 7 días después de la isquemia cerebral y 24 horas después del correspondiente entrenamiento.

4.1.5.6 Producción y micro-infusión de partículas retrovirales

El marcaje de las nuevas neuronas generadas en la ZSG del hipocampo se realizó mediante el empleo de un vector retroviral basado en el virus de la leucemia murina de Moloney. Bajo el promotor CAG, dicho vector contiene insertada la secuencia codificante para la proteína verde fluorescente (GFP). (CAG-GFP, Addgene). La obtención de un título elevado de retrovirus se llevó a cabo mediante la transfección del vector retroviral en células Gryphon Eco. 24, 48 y 72 horas tras la transfección se recogieron los medios de las células transfectadas que contenían las partículas retrovirales generadas y se almacenaron a 4°C. Tras la última recolección, se juntaron todos los medios de cultivo de las células transfectadas y se

ultracentrifugaron a 40.000G, tras lo cual se recogieron los sobrenadantes. Posteriormente, se procedió a la concentración de las partículas retrovirales mediante una ultracentrifugación a alta velocidad (60.000G), consiguiendo finalmente una titulación aproximada de 10^{7-8} UT/ml. A continuación, las partículas retrovirales se alicuotaron y se almacenaron a -80°C.

Para las infusiones, los animales se colocaron en un estereotáxico (KOPF Instruments, EE.UU.) y se mantuvieron anestesiados durante toda la cirugía mediante isofluorano (**Figura 20**). Se emplearon las correspondientes coordenadas estereotáficas siguiendo el atlas *Paxinos*. La infusión de las partículas retrovirales en el *hilus* del giro dentado (-2 mm antero-posterior, -1.4 mm medial-lateral relativo a bregma, y -2.4 mm dorso-ventral desde la superficie del cráneo) se realizó mediante una neurojeringa Hamilton (32-gauge) de 5 µl acoplada al estereotáxico, a una velocidad de 0.2 µl/min. El volumen de partículas retrovirales que se empleó en cada infusión fue de 2 µl. En el caso de los animales sometidos a isquemia cerebral, las infusiones se realizaron 14 días después de la cirugía tanto en los animales isquémicos (de manera bilateral) como en sus correspondientes controles. Tanto en los experimentos de isquemia cerebral como en el resto de experimentos, los animales se sacrificaron 28 días después de las infusiones.

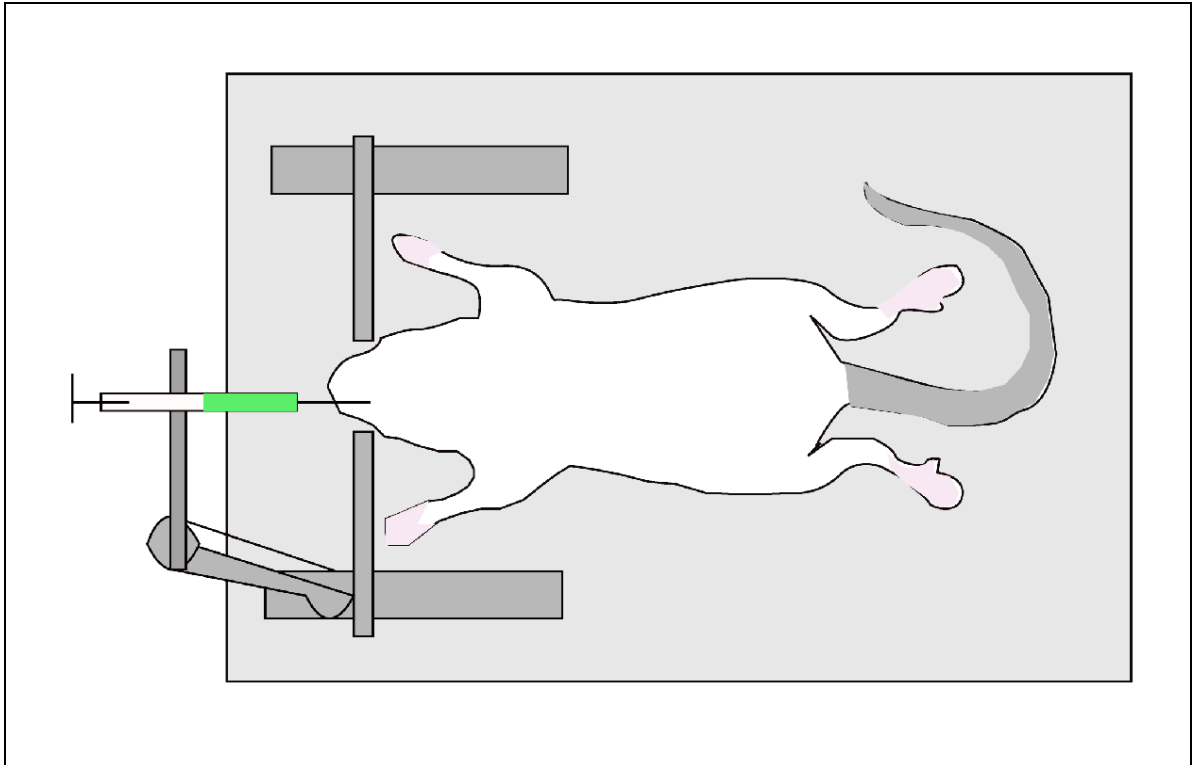


Figura 20. Representación de las cirugías estereotáticas para la infusión de las partículas retrovirales y TTX en el giro dentado de ratón.

4.1.5.7 Infusión de tetrodotoxina (TTX)

Para inactivar de manera transitoria el hipocampo se llevo a cabo infusiones bilaterales de tetrodotoxina (TTX, un bloqueante de los canales de sodio, Wako) (2,5 ng/ μ l). Para ello, los animales se colocaron en un estereotático (KOPF Instruments, EE.UU.) y se mantuvieron anestesiados durante toda la cirugía mediante isoflurano (Figura 20). La infusión de TTX en el giro dentado (-2.0 mm antero-posterior, -1.7 mm medial-lateral relativo a bregma, y -2.0 mm dorso-ventral desde la superficie del cráneo) se realizo mediante una neurojeringa Hamilton (32-gauge) de 5 μ l acoplada al estereotático, a una velocidad de 0,2 μ l/min. Tres horas antes de someter a los animales a los correspondientes tests de memoria, se infundió un volumen de 0.5 μ l de TTX en el grupo experimental y 0,5 μ l de PBS en el grupo control.

4.1.6 Diseño experimental

4.1.6.1 Evaluación de la función cognitiva (bloque I)

El esquema de la **Figura 21** muestra los diferentes tests de memoria dependientes de hipocampo empleados para evaluar la función cognitiva de los animales.

- **Sham:** animales sometidos a la exposición de la arteria carótida común izquierda y de la arteria cerebral media sin ligadura.
- **MCAO:** animales sometidos a MCAO.

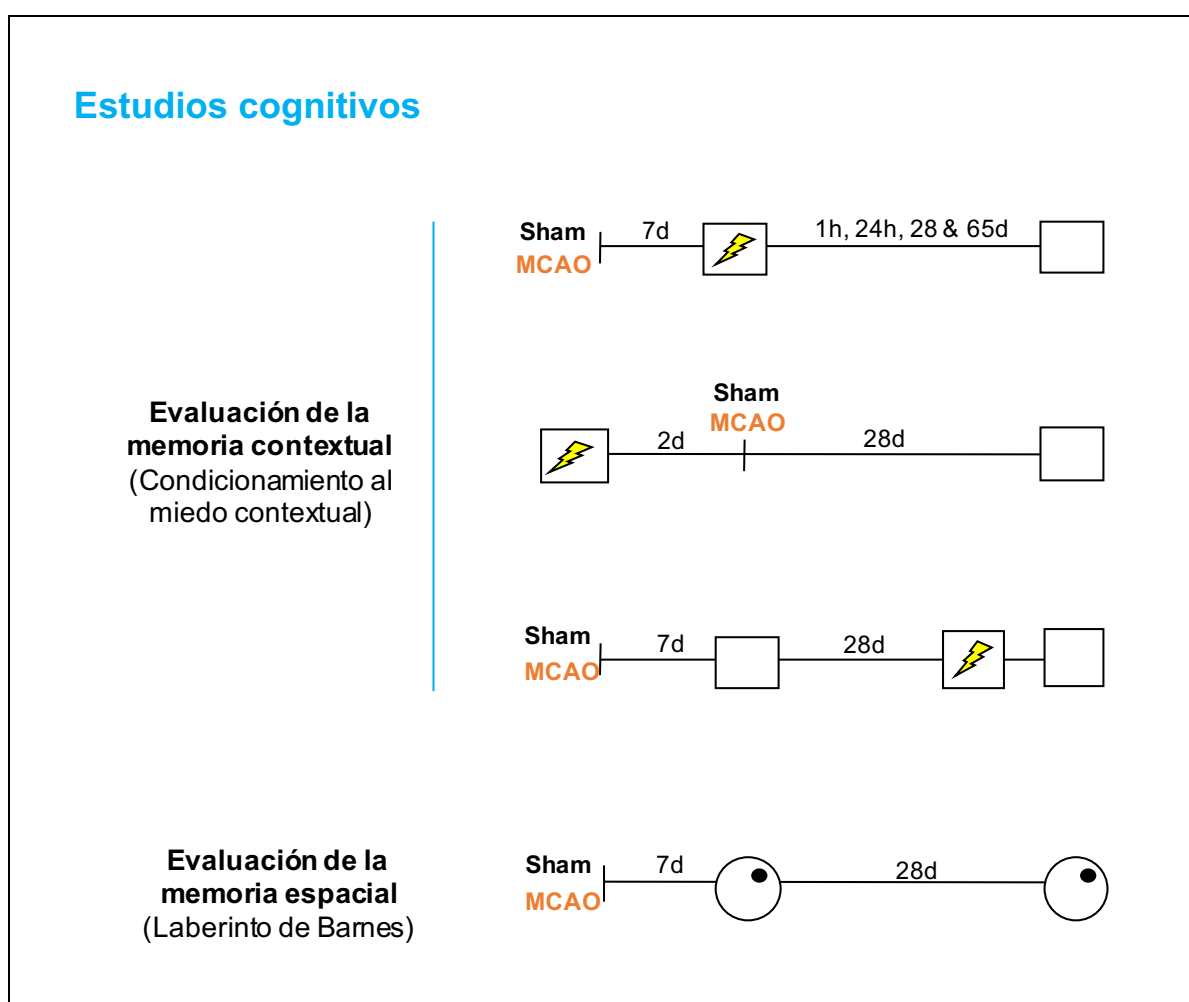


Figura 21. Diseño experimental de los diferentes test de memoria empleados para la evaluación del deterioro cognitivo producido tras isquemia cerebral.

4.1.6.2 Modulación de la neurogénesis hipocampal (bloque I)

El esquema de la **Figura 22** muestra las diferentes estrategias ambientales, farmacológicas y génicas empleadas para modular la neurogénesis hipocampal.

- **Ejercicio físico voluntario:** los animales tuvieron libre acceso a una rueda de correr durante cuatro semanas comenzando una semana después de la cirugía. Como controles se utilizaron animales con acceso a rueda pero ésta se mantuvo permanentemente bloqueada durante todo el experimento.
- **Memantina:** animales a los que se les administró una inyección i.p. semanal de memantina (MEM) 25 mg/Kg durante cuatro semanas comenzando una semana después de la cirugía. Como controles se utilizaron animales tratados con vehículo (BFS).
- **Temozolomida:** animales a los que se les administró 5 inyecciones semanales i.p. de temozolomida (TMZ) 25 mg/Kg durante cuatro semanas comenzando una semana después de la cirugía. Como controles se utilizaron animales tratados con vehículo (BFS).
- **Tamoxifeno:** animales a los que se les administró cinco inyecciones i.p de tamoxifeno 150 mg/Kg comenzando una semana después de la cirugía. Como controles se utilizaron animales tratados con vehículo (aceite de maíz).

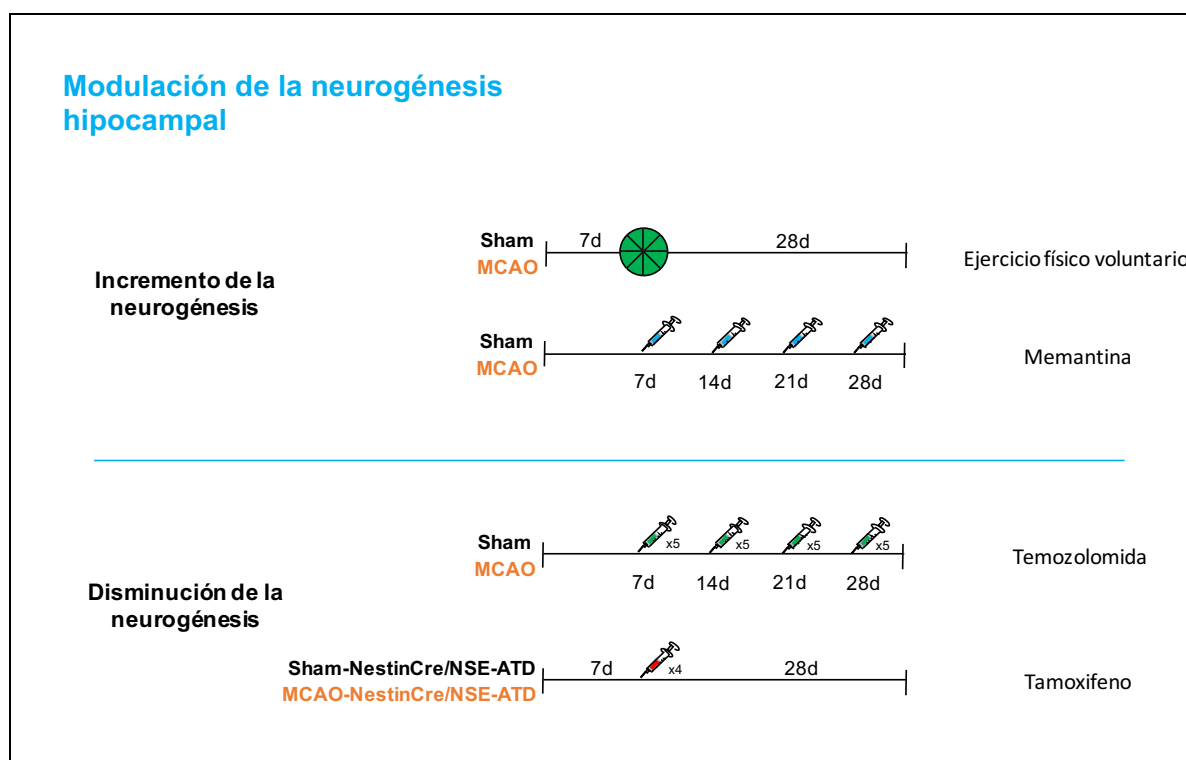


Figura 22. Estrategias empleadas para modular la neurogénesis hipocampal adulta tras someter a los animales a la cirugía. Los grupos controles utilizados para cada grupo experimental se sometieron a la correspondiente cirugía y se les administró el vehículo empleado en cada tratamiento.

4.1.6.3 Estudio de la memoria tras la inhibición transitoria del hipocampo (bloque I)

El esquema de la **Figura 23** muestra el diseño experimental seguido para inactivar temporalmente la activación del hipocampo.

- **Sham:** animales a los que se les infundió TTX en el hipocampo.
- **MCAO:** animales a los que se les infundió TTX en el hipocampo.

Tanto los animales sham como los MCAO fueron infundidos con TTX en el hipocampo veintiocho días después de la cirugía y la memoria se analizó tres horas tras la infusión.

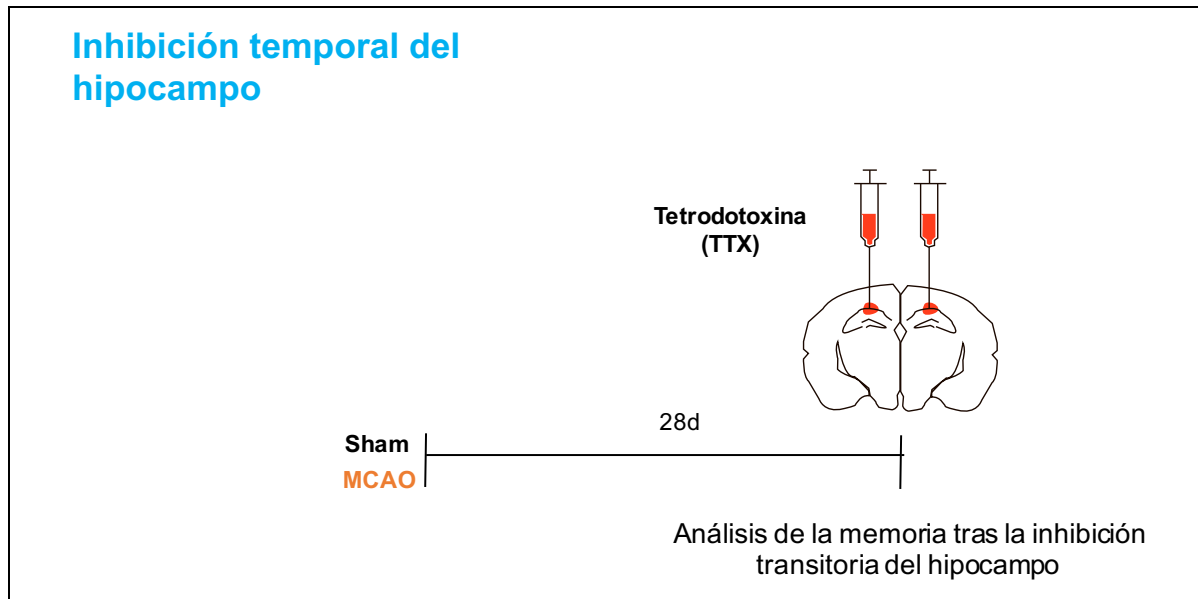


Figura 23. Protocolo experimental seguido para la infusión de TTX e inactivación de los hipocampos de los animales tras la cirugía.

4.1.6.4 Estudios morfológicos de las nuevas neuronas maduras (bloque I)

El esquema de la **Figura 24** muestra el diseño experimental seguido para marcar y analizar las características morfológicas de las nuevas neuronas maduras generadas tras la cirugía.

- **Sham:** animales a los que se les infundió retrovirus GFP en el GD.
- **MCAO:** animales a los que se les infundió retrovirus GFP en ambos hipocampos.

En ambos casos, las infusiones se realizaron catorce días tras la cirugía y los análisis morfológicos se realizaron veintiocho días después tras las infusiones.

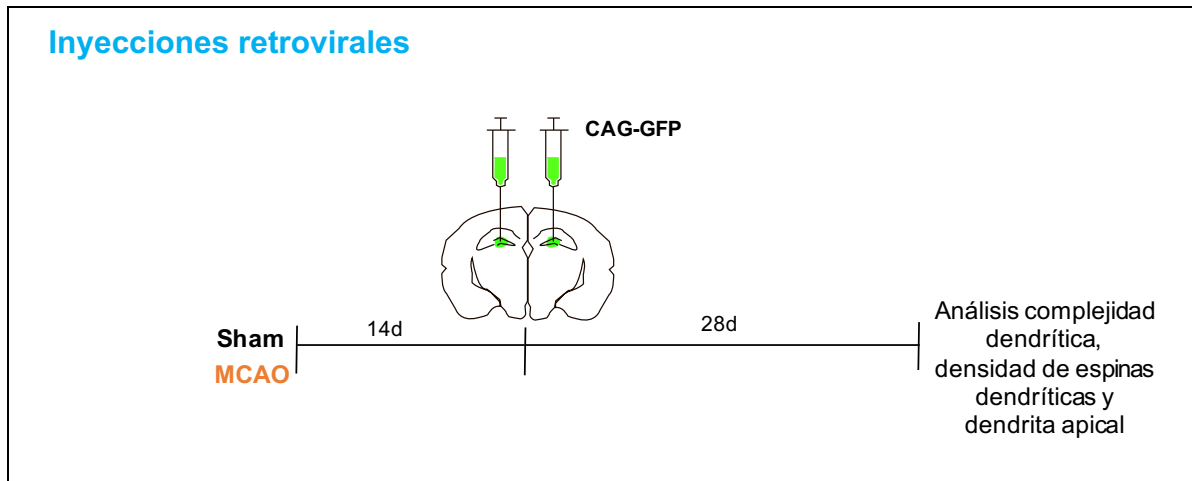


Figura 24. Protocolo experimental seguido para la infusión de partículas retrovirales GFP en el hipocampo de los animales tras la cirugía y análisis morfológico de las nuevas neuronas maduras generadas.

4.1.6.5 Estudio de la neurogénesis hipocampal (bloque I)

El esquema de la **Figura 25** muestra el diseño experimental seguido para el análisis de las diferentes etapas de la neurogénesis hipocampal tras la cirugía.

- **Proliferación y nuevas neuronas inmaduras:** estudio temporal de los niveles de células proliferativas (Ki67) y neuronas nuevas inmaduras (DCX) tras la cirugía.
- **Integración de nuevas neuronas:** los animales recibieron dos rondas de inyecciones i.p de BrdU (100 mg/Kg), 5 inyecciones/ronda, comenzando diez días después de la cirugía, para analizar a los 65 días tras la isquemia las nuevas neuronas integradas.

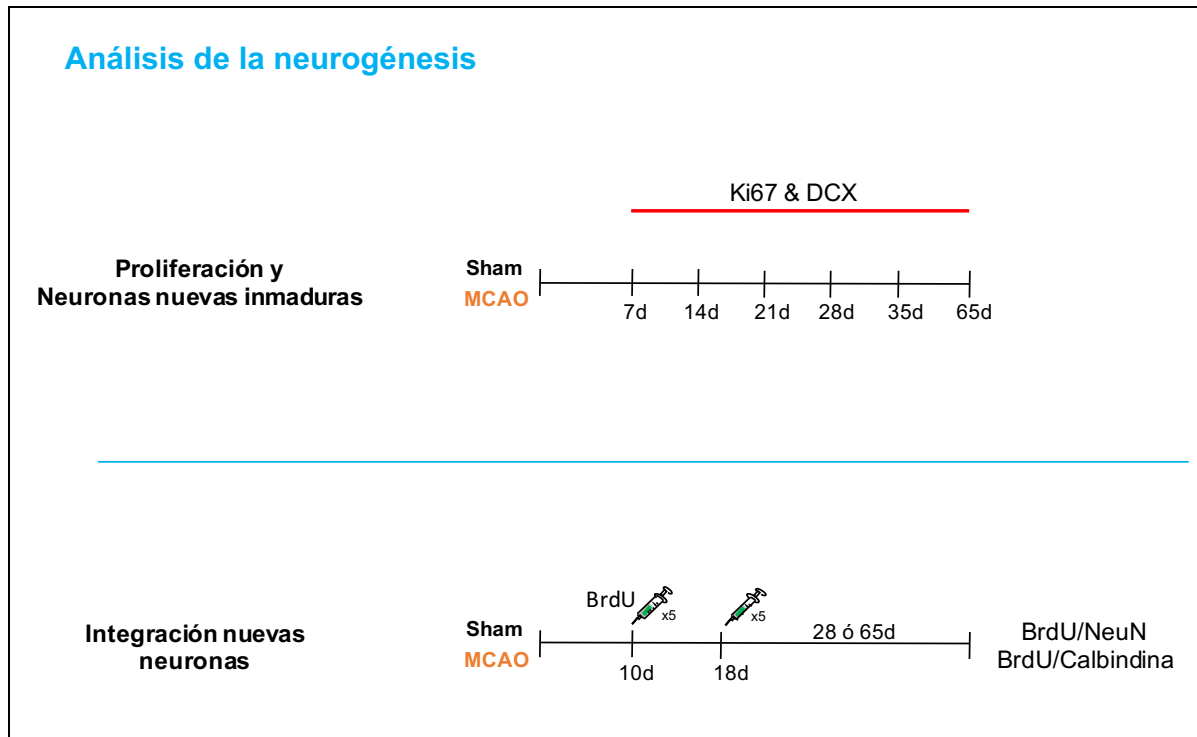


Figura 25. Protocolo experimental seguido para el análisis de la variación en cuanto a la proliferación (Ki67), nuevas neuronas inmaduras (DCX) y neuronas nuevas integradas (BrdU/NeuN o BrdU/Calbindina) 65 días tras la cirugía.

4.1.6.6 Evaluación de la función cognitiva (bloque II)

El esquema de la **Figura 26** muestra los diferentes tests de memoria dependientes de hipocampo empleados para evaluar la función cognitiva de los animales.

- **WT:** animales salvajes que presentan los dos alelos codificantes para AhR.
- **AhR^{-/-}:** animales transgénicos en donde el exón 3 del gen codificante para AhR se encuentra deletado.
- **AhR^{f/f}:** animales transgénicos que tienen floxeado el exón 2 del gen codificante para AhR.

- **NestinCre-AhR^{ff}**: animales transgénicos en donde la activación de la Cre recombinasa en las células nestina⁺ tras la administración de tamoxifeno induce la escisión de las secuencias loxP del exón 2 del gen codificante para AhR.

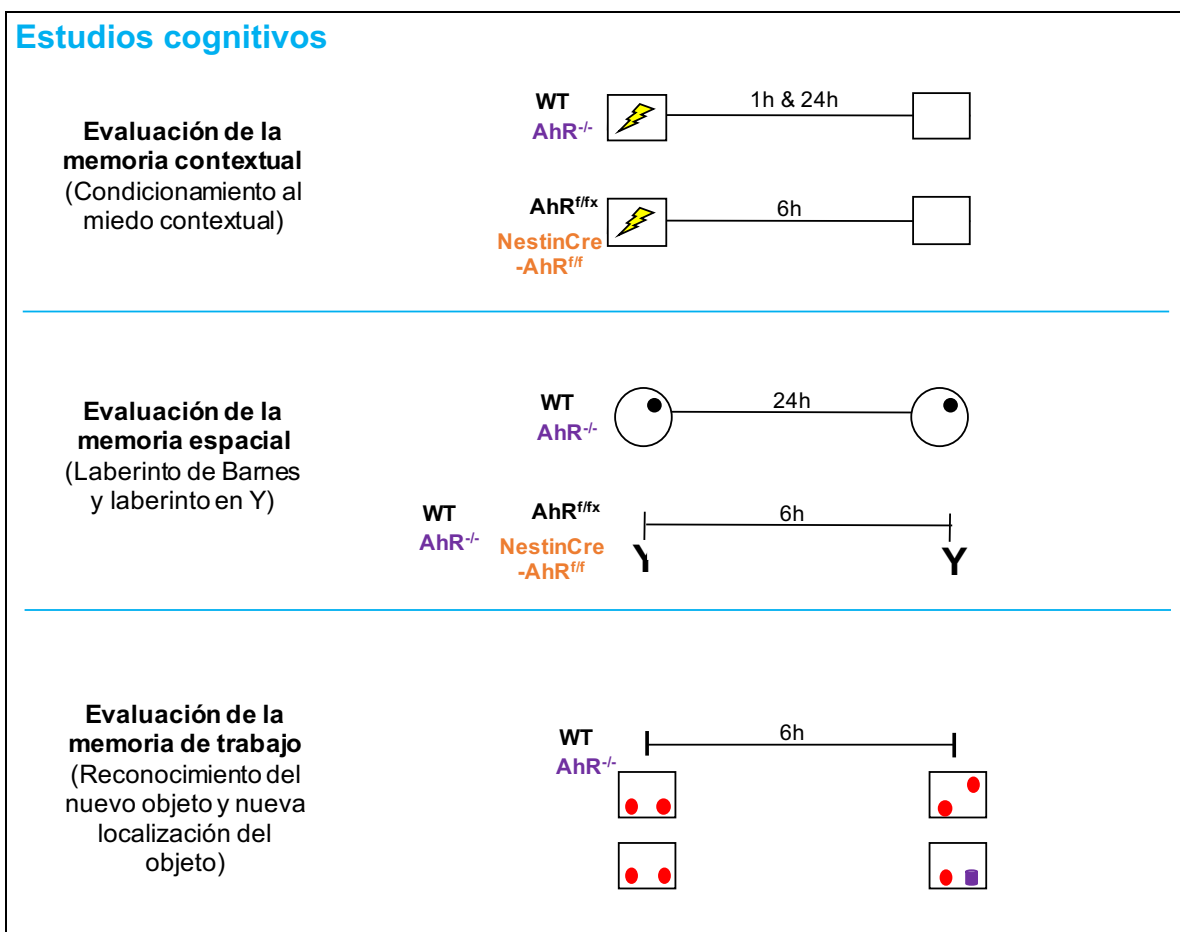


Figura 26. Diseño experimental de los diferentes test de memoria empleados para la evaluación las alteraciones cognitivas en ausencia de AhR.

4.1.6.7 Estudios morfológicos de las nuevas neuronas maduras (bloque II)

El esquema de la **Figura 27** muestra el diseño experimental seguido para marcar y analizar las características morfológicas de las nuevas neuronas maduras generadas en presencia y/o ausencia de AhR.

- **WT y AhR^{-/-}** : animales a los que se les infundió retrovirus GFP en un único hipocampo.

En ambos casos, los análisis morfológicos se realizaron veintiocho días después tras las infusiones.

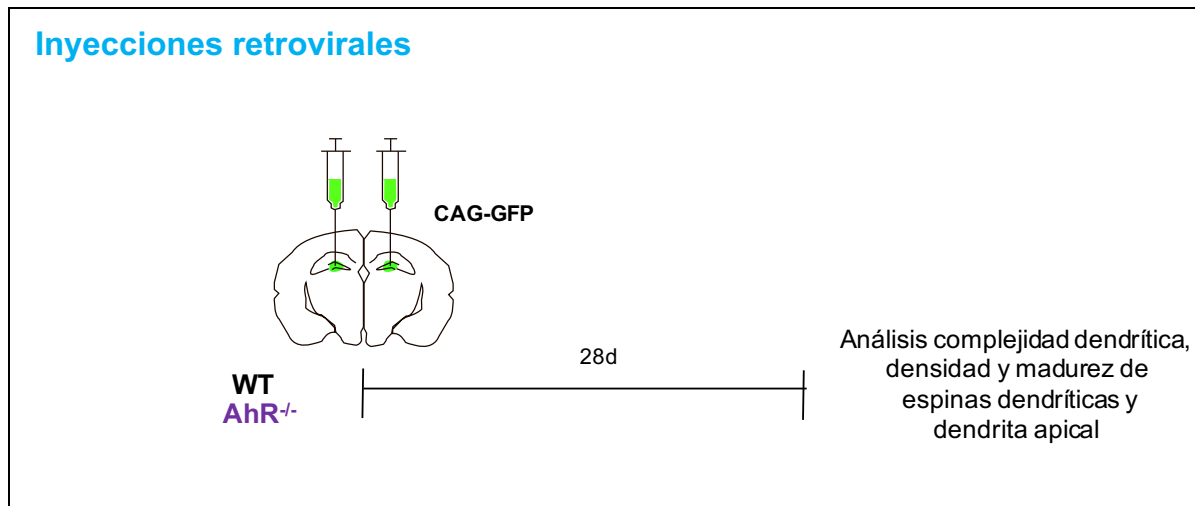


Figura 27. Protocolo experimental seguido para la infusión de partículas retrovirales GFP en el hipocampo de los animales WT y AhR^{-/-} y análisis morfológico de las nuevas neuronas maduras generadas.

4.1.6.8 Estudio de la neurogénesis hipocampal (bloque II)

El esquema de la **Figura 28** muestra el diseño experimental seguido para el análisis de las diferentes etapas de la neurogénesis hipocampal en presencia y/o ausencia de AhR.

- **Pool de células madre:** se administraron cuatro inyecciones i.p. de BrdU (150 mg/Kg) cada dos horas para analizar las variaciones del *pool* de células madre en estado de reposo (nestin⁺/GFAP⁺/BrdU⁻) y proliferativo (nestin⁺/GFAP⁺/BrdU⁺) a diferentes edades (p30 y p100) en presencia y/o ausencia de AhR.

- **Proliferación y nuevas neuronas inmaduras:** estudio de los niveles de las células proliferativas (Ki67) y neuronas nuevas inmaduras (DCX) en presencia y/o ausencia de AhR de manera constitutiva ($AhR^{-/-}$) o inducible ($NestinCre-AhR^{f/f}$).
- **Integración de nuevas neuronas:** los animales recibieron una ronda de cinco inyecciones i.p de BrdU (100 mg/Kg) para analizar veintiocho días después las nuevas neuronas integradas.

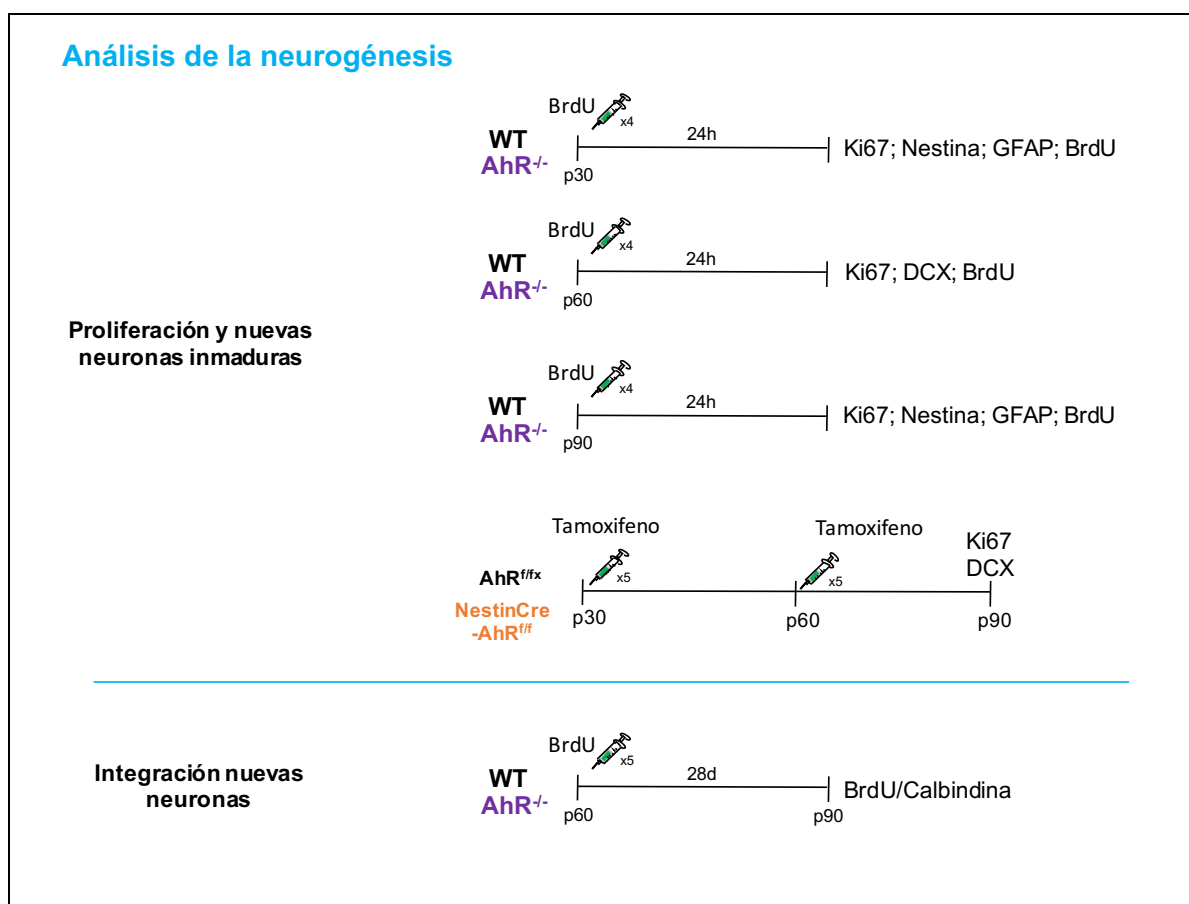


Figura 28. Protocolo experimental seguido para el análisis del *pool* de células madre en estado de reposo ($nestin^{+}/GFAP^{+}/BrdU^{-}$) y proliferativo ($nestin^{+}/GFAP^{+}/BrdU^{+}$), de proliferación (Ki67), de nuevas neuronas inmaduras (DCX) y de neuronas nuevas integradas (BrdU/Calbindina) en presencia y/o ausencia de AhR.

4.1.7 Procesamiento de muestras

4.1.7.1 Preparación del tejido para estudios de inmunofluorescencia

Los animales se sacrificaron mediante sobredosis de isoflurano en una cámara de inducción de anestesia con una mezcla de oxígeno/aire comprimido (0,2/0,8L/min). A continuación, se perfundieron con una solución de lavado a través del ventrículo izquierdo (tampón fosfato 0,1M, pH 7.4), seguido de una solución fijadora de paraformaldehído (PFA) al 4% en tampón fosfato 0,1M. Se extrajo el cerebro y se mantuvo durante 12 horas a 4°C en PFA al 4% para favorecer la fijación tisular. Posteriormente, el cerebro se mantuvo en una solución de sacarosa al 30% en tampón fosfato 0,1M durante 72 horas a 4°C para su deshidratación. Finalmente, el tejido se congeló mediante un proceso de congelación rápida en isopentano (Sigma Aldrich) a -40°C y se almacenó a -80°C hasta el momento de su procesamiento.

Para los estudios histológicos por inmunofluorescencia, se realizaron secciones coronales de 30µm de grosor mediante un microtomo de congelación (Leica). Se utilizaron series de secciones 1:5 con una distancia entre ellas de 150 µm.

4.1.7.2 Preparación del tejido para estudios de citometría de flujo

Los animales se sacrificaron mediante sobredosis de isoflurano 5% en una cámara de inducción de anestesia con una mezcla de oxígeno/aire comprimido (0,2/0,8L/min). Rápidamente se extrajo el cerebro y se llevó a cabo la disección de la ZSV como de la ZSG en *Hank's Balanced Salt Solution* (HBSS 1X) frío. A continuación, ambas regiones se trocearon y se procedió a su disgregación enzimática durante 15 minutos a 37°C (0,025 U/ml de DNAasa y 2,5% papaína en

HBSS 1X sin Ca^{2+} ni Mg^{2+}). Posteriormente, se llevó a cabo la disgregación mecánica con pipetas para conseguir una suspensión celular única. Finalmente, dicha suspensión se filtró a través de filtros de nylon con un tamaño de poro de 70 μm y se centrifugó a 300 G durante 10 minutos a temperatura ambiente.

A continuación se procedió a realizar la tinción de los marcadores intracelulares BrdU y Nestin. Para ello, la suspensión celular se fijó y permeabilizó siguiendo las instrucciones del kit (BD Cytofix/Cytoperm Kit BrdU Flow Kits BD Biosciences). Posteriormente, las células se incubaron con los anticuerpos anti-BrdU-APC, anti-Nestin-PE junto con los correspondientes controles isotípicos, siguiendo las instrucciones del fabricante (BD Cytofix/Cytoperm Kit, BrdU Flow Kits BD Biosciences) ([Tabla 7](#)). Finalmente, las células se lavaron y se resuspendieron en 300 μl de FACS Flow para proceder a su análisis mediante un citómetro FACS Scalibur.

Anticuerpo	Origen	Dilución	Casa comercial
Anti-BrdU-APC	Ratón	1:250	BD Pharmingen
Anti-Nestin-PE	Ratón	1:100	BD Pharmingen

Tabla 7. Lista de anticuerpos empleados en los experimentos de citometría de flujo.

4.1.7.3 Preparación del tejido para estudios morfológicos

Para el análisis morfológico de las neuronas granulares maduras del giro dentado se llevó a cabo una tinción histológica basada en el método Golgi-Cox mediante el empleo del kit FD Rapid GolgiStain (FD Neuro Technologies, Columbia, EE.UU.). Para ello, los animales se sacrificaron tras someterlos durante 10 minutos a isoflurano al 5% en una cámara de inducción de anestesia con una mezcla de oxígeno/aire comprimido (0,2/0,8L/min). Rápidamente se extrajeron los cerebros y se incubaron en solución de impregnación durante 2 semanas a temperatura ambiente. Posteriormente, se procedió a su deshidratación en una solución de sacarosa al 30% durante 48 horas. Finalmente, mediante el empleo de un vibratomo (Leica VT1000s) se obtuvieron secciones de cerebro de 100 μm de grosor a lo largo del eje rostro-caudal del hipocampo y se procedió a su tinción siguiendo las instrucciones del fabricante.

4.1.7.4 Preparación del tejido para estudios electrofisiológicos

Los animales se sacrificaron mediante sobredosis de isoflurano en una cámara de inducción de anestesia con una mezcla de oxígeno/aire comprimido (0,2/0,8L/min). Rápidamente se extrajeron los cerebros y se mantuvieron en una solución fría burbujeada con carbógeno (95% O_2 y 5% CO_2 , pH 7,3) de líquido cefalorraquídeo artificial (ACSF) que contenía (en mM): NaCl 124, KCl 2,69, KH_2PO_4 1,25, MgSO_4 2, NaHCO_3 26, CaCl_2 2, ácido ascórbico 0,4 y glucosa 10. A continuación, los cerebros se seccionaron mediante un vibratomo (Leica VT 1200S) y se obtuvieron secciones sagitales hipocampales (325 μm de grosor) que se mantuvieron durante 1 hora a temperatura ambiente en ACSF. Posteriormente, las secciones se transfirieron a una cámara de registro y se mantuvieron perfundidas (1ml/min) con

ACSF que contenía 50 μM de picrotoxina para bloquear los receptores GABA_A. Durante los experimentos se mantuvo la temperatura controlada a 25°C mediante un registro térmico (Warner Instruments). La visualización de las neuronas granulares del GD se llevó a cabo mediante un condensador Nomarski y un objetivo de inmersión 40x en combinación con un detector de infrarrojos en un microscopio Eclipse FN1 Nikon. Para los registros electrofisiológicos de célula entera en las neuronas granulares se utilizaron pipetas de patch (3-4 M Ω de resistencia) de cristal de borosilicato (diámetro externo de 1.5mm) fabricadas con un puller P-97 (Sutter-Instrument) y cuya solución interna contenía (en mM): K-Gluconato 135, KCl 10, HEPES 10, MgCl₂ 1, ATP-Na₂ (pH 7,3 y osmolaridad 280-290mOsm/L). Tras la formación de la configuración célula-completa (potencial a -70mV), se llevaron a cabo las correspondientes medidas electrofisiológicas.

4.1.8 Técnicas experimentales

4.1.8.1 Estudio de poblaciones celulares por citometría de flujo

Para el análisis de las distintas poblaciones celulares de la ZSV y ZSG por citometría se utilizó un citómetro de flujo FACSCalibur® (Becton Dickinson S.A., EE.UU.) y el software BD Cellquest™ PRO (Becton Dickinson S.A., EE.UU.). Los parámetros de adquisición se definieron en función del tamaño y la complejidad celular (SSC-A y FSC-A, respectivamente) de las poblaciones analizadas. El análisis, compensación y procesados de los datos adquiridos se llevó a cabo empleando el software FlowJO (TreeStar inc, EE.UU.).

4.1.8.2 Inmunotinción del tejido cerebral

La detección de proteínas específicas por inmunofluorescencia en el tejido cerebral se realizó a partir de secciones de cerebro de 30 μm separadas 150 μm entre sí. Tras realizar 3 lavados con PBS 1X, se procedió a la permeabilización y bloqueo de las uniones inespecíficas del tejido mediante la incubación de las secciones en PBS 1X con 0,25% de Tritón X-100 (PBST) y 5% de suero (Jackson Immuno Research, EE.UU.) durante 2 horas a temperatura ambiente en agitación. A continuación, se procedió a la incubación de las secciones con los correspondientes anticuerpos primarios diluidos en solución PBST y 5% de suero durante 16-18 horas a 4°C en agitación (Tabla 8). Tras realizar 3 lavados con PBST, se procedió a la incubación de las secciones con los anticuerpos secundarios (Tabla 8) diluidos en PBST y con 2,5% de suero durante 2 horas a temperatura ambiente en agitación. Finalmente las secciones se lavaron 3 veces con PBS y se montaron con medio de montaje para inmunofluorescencia.

La visualización y adquisición de microfotografías se llevó a cabo mediante un microscopio confocal Zeiss (Zeiss LSM 710) y el software ZEN 2009 (Carl Zeiss Microimaging GmbH). Para validar la colocación de las combinaciones de anticuerpos se utilizaron proyecciones ortogonales de las imágenes. El procesamiento de las imágenes se realizó con los programas Adobe Illustrator CS6 y FIJI.

Anticuerpos 1^{rios}	Origen	Dilución	Casa comercial
Anti AhR	Conejo	1:250	Enzo Life Sciences
Anti Nestin-PE	Ratón	1:100	BD Pharmingen
Anti Ki67	Conejo	1:250	Abcam
Anti DCX	Cabra	1:250	Santa Cruz
Anti NeuN	Ratón	1:400	Millipore
Anti Calbindin	Cabra	1:500	Santa Cruz
Anti BrdU	Rata	1:200	AbD Serotec
Anti GFP	Pollo	1:700	ThermoScientific
Anti ZnT3	Cabra	1:3000	Santa Cruz
Anti c-Fos	Conejo	1:1000	Santa Cruz
Anticuerpos 2^{rios}	Origen	Dilución	Casa comercial
Anti conejo Cy3	Burro	1:250	ThermoScientific
Anti cabra 488	Burro	1:500	ThermoScientific
Anti ratón 488	Burro	1:500	ThermoScientific
Anti rata Cy3	Burro	1:250	ThermoScientific
Anti pollo 488	Burro	1:500	ThermoScientific
Anti conejo 488	Cabra	1:500	ThermoScientific

Tabla 8. Lista de anticuerpos primarios y secundarios empleados para las tinciones de inmunofluorescencia.

4.1.8.3 Cuantificación de las poblaciones celulares en los nichos neurogénicos

Para la cuantificación semiautomática tanto del área como del volumen de células proliferativas (Ki67⁺) y nuevas neuronas inmaduras (DCX⁺) en la ZSV, se tomaron microfotografías (20x) en 5-7 secciones (30 μ m) por animal espaciadas 150 μ m mediante microscopia confocal (distribuidas desde -1,46mm a -2,3mm relativo a bregma) y se llevó a cabo su análisis a través del *software* Volocity (Improvision). Para ello, se definió un tamaño de voxel apropiado (correspondiente a cada marcador) de manera previa a su análisis.

Para la cuantificación del número de células madre neurales (nestin⁺), células proliferativas (Ki67⁺) y nuevas neuronas inmaduras (DCX⁺) en el hipocampo, se tomaron microfotografías (20x) en 5-7 secciones (30 μ m) por animal espaciadas 300 μ m mediante microscopia confocal (distribuidas desde -1,46mm a -2,3mm relativo a bregma). A continuación se llevó a cabo la cuantificación de cada uno de los subtipos celulares atendiendo exclusivamente a aquellas localizadas en la región de la ZSG del hipocampo. Dicha cuantificación se realizó mediante el empleo del software FIJI.

Para la cuantificación del número de células madre neurales tipo 1 en estado proliferativo (Nestin⁺/GFAP⁺/BrdU⁺), células madre neurales tipo 2 (Nestin⁺/GFAP⁻/BrdU⁺), así como del número de nuevas neuronas integradas (Calbindina⁺/BrdU⁺ o NeuN⁺/BrdU⁺) en el hipocampo, se tomaron microfotografías (63x) en 5-7 secciones (30 μ m) por animal, espaciadas 150 μ m mediante microscopia confocal (distribuidas desde -1,46mm a -2,3mm relativo a bregma). Las colocalizaciones entre los distintos marcadores se confirmaron mediante las proyecciones

ortogonales de las microfotografías en z-stack mediante el software ZEN 2009 (Zeiss).

4.1.8.4 Análisis morfológicos

Para el análisis morfológico de las neuronas granulares del giro dentado teñidas mediante la tinción Golgi-Cox, se llevó a cabo la reconstrucción de un total de 8-10 neuronas por animal, seleccionadas aleatoriamente mediante el *software* Neurolucida Neuron Tracing System (Microbrightfield, Colchester, VT). La cuantificación de la longitud dendrítica total y el análisis Sholl se llevaron a cabo mediante el software Neuroexplorer (Microbrightfield, Colchester, VT) a partir de las reconstrucciones obtenidas previamente. El análisis de Sholl se llevó a cabo mediante la cuantificación del número de segmentos dendríticos que se cruzan con círculos concéntricos desde el soma neuronal a intervalos de 10 μ m. Para el cálculo de la densidad de espinas dendríticas, se trazó un segmento de 10 μ m de longitud situado en la capa molecular del GD y se procedió a cuantificar el número de espinas distribuidas a lo largo de dicho segmento. Para estos análisis, se seleccionaron aleatoriamente un total de 8-10 segmentos dendríticos de diferentes neuronas por animal.

La cuantificación de la longitud de la dendrita apical primaria de las nuevas neuronas inmaduras (DCX⁺) y de las nuevas neuronas maduras (GFP⁺) se llevó a cabo mediante el trazado manual desde el soma hasta el primer punto de ramificación. Se seleccionaron aleatoriamente un total de 20-25 células para dicho análisis. Para la determinación de dicha longitud se empleó el software FIJI.

Para analizar el patrón de distribución dendrítica de las nuevas neuronas inmaduras (DCX⁺) en las diferentes capas del GD (granular y molecular), se llevó a

cabo un análisis densitométrico de dicho marcador y se representó como el porcentaje de DCX dendrítico de cada capa respecto al total del marcaje de DCX en el GD. Dichos análisis se realizaron mediante el software FIJI.

Para el análisis morfológico de las nuevas neuronas (GFP⁺) se seleccionaron aleatoriamente un total de 8-15 neuronas por animal y se tomaron microfotografías (40x) mediante microscopía confocal. A continuación se llevó a cabo su reconstrucción tridimensional mediante el *plugin Simple Neurite Tracer* del software FIJI. La cuantificación de la longitud dendrítica total así como el análisis de Sholl se realizaron mediante el *plugin Sholl analysis* del software FIJI. Para la determinación de la densidad de espinas dendríticas se seleccionaron aleatoriamente un total de 8-10 segmentos dendríticos de la capa molecular del GD y se tomaron microfotografías (40x, apertura numérica 1.4, zoom digital 3) mediante microscopía confocal a intervalos 0.5µm. A continuación, dichas imágenes se sometieron a dos rondas de deconvolución mediante el software AutoDeblur (AutoQuant, Troy, NY, EE.UU.). La determinación de la densidad de espinas dendríticas se llevó a cabo dividiendo el número total de espinas distribuidas a lo largo de cada segmento dendrítico por la longitud de dicho segmento. Para la cuantificación de espinas dendríticas tipo “fungiforme”, se seleccionaron aleatoriamente 8-12 segmentos dendríticos de cada animal. Se aceptó como espina dendrítica tipo “fungiforme” toda aquella cuya superficie estimada fuera mayor o igual a $0.4\mu\text{m}^2$ ($= \frac{\pi \times D_{\text{mayor}} \times D_{\text{menor}}}{4}$) (Zhao et al., 2014; Zhao et al., 2006).

4.1.8.5 Análisis de la densidad de terminales presinápticos en CA3

Para el análisis de la densidad de terminales presinápticos correspondientes a los axones de las nuevas neuronas inmaduras del GD (DCX^+), se tomaron microfotografías (40x) en 5-7 secciones ($30\mu m$) por animal, espaciadas $150\mu m$ mediante microscopia confocal (distribuidas desde $-1,46mm$ a $-2,3mm$ relativo a bregma) en la región de CA3 del hipocampo a 63X. A continuación se llevó a cabo un análisis densitométrico del marcador DCX en esta región y los resultados se representaron como el cociente entre la cantidad de marcaje de DCX en CA3 respecto al número de neuroblastos en el GD.

4.1.8.6 Registros electrofisiológicos en las neuronas granulares

Para los análisis del patrón de disparo y de las relaciones corriente-voltaje, se inyectó una serie de corrientes crecientes (30pA, duración 500ms en intervalos de 3 segundos) en el modo corriente mantenida. Para el análisis de las corrientes excitatorias postsinápticas (CEP) inducidas por parte de las neuronas granulares del GD (potencial mantenido a $-70mV$) se llevó a cabo la estimulación de las aferencias glutamatérgicas procedentes del tracto perforante mediante un capilar bipolar theta ($2-5\mu m$ de diámetro) relleno con solución FMEA colocado en la capa molecular del GD, y se procedió a su grabación. Los estímulos se configuraron con una frecuencia de 0,33 Hz. El análisis del *ratio* del pulso pareado (*paired pulse ratio*, PPR) ($2^{\circ}CEP / 1^{\circ}CEP$) se llevó a cabo a partir de la liberación de pulsos pareados (a intervalos de 20, 50, 75, 100, 150 y 200 ms entre los diferentes estímulos). El análisis del cociente AMPA/NMDA ($2^{\circ}CEP$ a $+40mV / 1^{\circ}CEP$ a $-60mV$ con el potencial mantenido) se obtuvo a partir de la liberación de pulsos pareados a intervalos de 50 ms entre los diferentes estímulos. En todos los

experimentos se mantuvieron monitorizados los valores de la resistencia empleando un pulso a -5mV . Para todos los experimentos se consideraron como registros estables solo aquellos en donde los artefactos en relación a los valores de resistencia y potencial de membrana en reposo no cambiaron más del 20%. Las neuronas que no cumplieron estos criterios fueron descartadas. La grabación de los registros y amplificador de las señales se llevó a cabo mediante un amplificador PC-ONE y un PC Pentium acoplado a un digitalizador DigiData1322A. La generación de los estímulos, configuración, adquisición, almacenamiento y análisis de datos se llevó a cabo mediante el software pCLAMP 10.2.

4.1.9 Análisis estadístico

Los datos se analizaron utilizando el software PRISM 6.0 (GraphPad Software Inc.). Se realizaron tests no paramétricos Mann-Whitney para comparar dos grupos y una ANOVA de una o dos vías, seguido de una prueba post-hoc de Dunns o Bonferroni, respectivamente, para comparar más de dos grupos. En el caso de ser necesario, se realizó una correlación no paramétrica de Spearman y se procedió a un análisis de regresión lineal. Los datos se expresaron como media \pm error estándar de la media (EEM) y una $p < 0.05$ se asumió como estadísticamente significativa.

5

RESULTADOS PARTE I

5.1 EFECTO DE LA INHIBICION DE LA RESPUESTA NEUROGENICA HIPOCAMPAL EN EL DETERIORO COGNITIVO TRAS ISQUEMIA CEREBRAL EXPERIMENTAL

5.1.1 Estudio de la función cognitiva tras isquemia cerebral experimental

El deterioro cognitivo es una de las principales consecuencias de la isquemia cerebral durante su fase crónica. En relación a la función cognitiva, el hipocampo es una de las estructuras subcorticales más relevantes en este proceso, encargándose principalmente de las memorias de tipo contextual y espacial. Con el fin de analizar si tras un daño cortical isquémico se produce un déficit cognitivo asociado al hipocampo, se llevó a cabo la evaluación de la función cognitiva de animales sometidos a nuestro modelo de isquemia cerebral permanente, explorando específicamente la memoria dependiente de hipocampo.

5.1.1.1 Alteraciones de la memoria contextual tras isquemia cerebral

En primer lugar, se evaluó si la isquemia cerebral podría afectar a la formación de nuevas memorias. Para ello, siete días tras la isquemia cerebral, los animales fueron sometidos al test del condicionamiento al miedo contextual (CMC). Durante la fase de condicionamiento, los animales se introdujeron en un contexto nuevo para ellos y recibieron shocks eléctricos para promover la formación de una nueva memoria de tipo asociativo estableciendo una relación entre dicho contexto y el estímulo aversivo. Mediante esta estrategia, se llevó a cabo el análisis de la posible afectación de la memoria reciente y remota (1 y 28 días después de la fase de condicionamiento, respectivamente) (Figura 29), calculada como la respuesta estereotípica de *congelación* que manifiestan los animales en la fase de recuerdo.

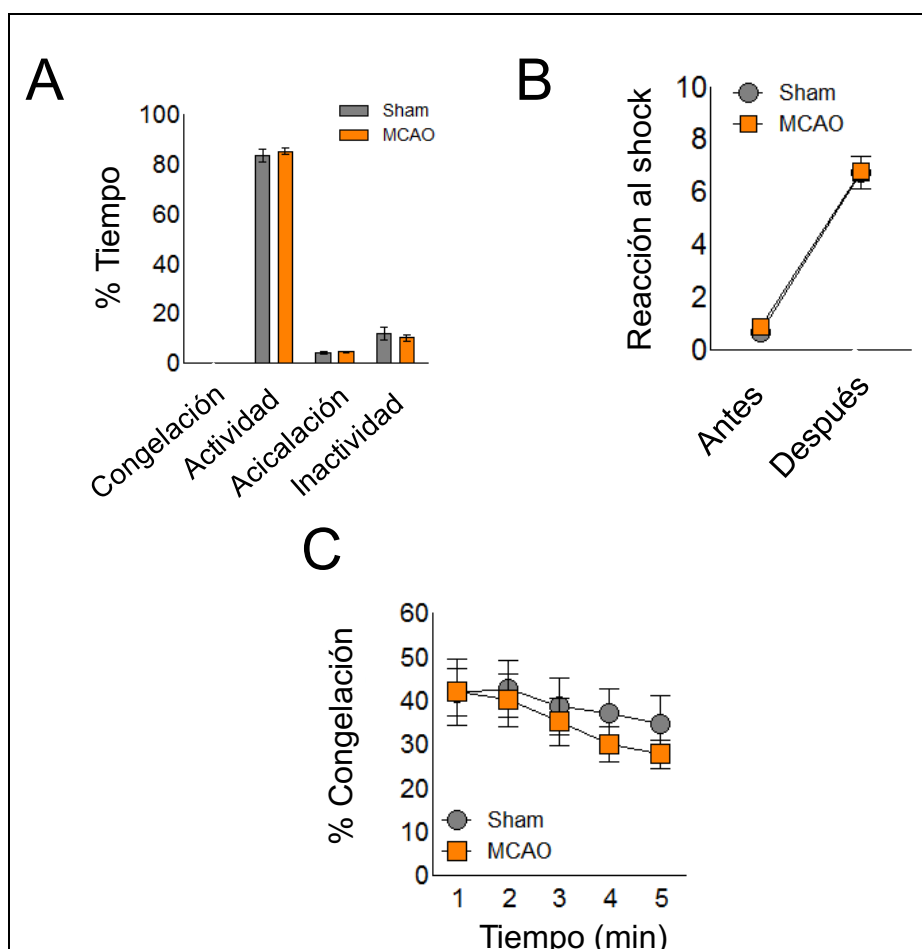


Figura 29. La isquemia cortical induce deterioro cognitivo dependiente del hipocampo. (A)

Cuantificación del % de respuesta de congelación en los animales sham e isquémicos durante la fase de familiarización en el test del condicionamiento al miedo contextual (CMC) (150 s antes de recibir el estímulo aversivo). En la gráfica se representa el % de tiempo empleado por los animales sham e isquémicos en los diferentes comportamientos desarrollados durante esta fase (congelación, actividad, inactividad y acicalación) ($p > 0.05$ vs. sham; Sham, $n = 8$; MCAO, $n = 9$). **(B)** Cuantificación de la reacción al shock en los animales sham e isquémicos durante el CMC. Los datos representan el cociente entre la distancia viajada durante los 5 s inmediatamente después de recibir el shock y los 5 s antes de recibir el shock. Los datos se muestran como unidades arbitrarias (UA). Se identificaron diferencias entre el efecto del shock y los diferentes grupos ($(F(1,15) = 279.15; *p < 0.05)$; Sham, $n = 8$; MCAO, $n = 9$). **(C)** Porcentaje de respuesta de congelación de los animales sham e isquémicos 1 h después del CMC. Se identificaron diferencias en cuanto al efecto de la variable tiempo ($(F(4,32) = 6.85; *p < 0.05)$; Sham, $n = 5$; MCAO, $n = 5$) pero no entre los grupos sham e isquémicos. Estadística: **(B y C)** ANOVA de dos vías no paramétrica seguida de un post-test de Bonferroni.

Durante la fase de condicionamiento, tanto los animales isquémicos como los sham presentaron niveles similares de actividad exploratoria (**Figura 29, A**) y de reactividad ante el estímulo aversivo (**Figura 29, B**). Por otro lado, la isquemia

cerebral no produjo ningún efecto sobre la capacidad de aprendizaje de nuevas memorias, ya que ambos grupos presentaron niveles similares de congelación una hora tras el condicionamiento a lo largo de todo el ensayo (**Figura 29, C**).

De igual forma, durante la fase de recuerdo de la memoria reciente, no se observaron diferencias en la respuesta de congelación 24 horas tras el condicionamiento (**Figura 30, B**). Sin embargo, cuando analizamos la capacidad de retención de memorias remotas (28 días después del condicionamiento), los animales isquémicos presentaron una reducción en la respuesta de congelación respecto a los animales sham (**Figura 30, C**). Estas alteraciones cognitivas se observaron incluso hasta 2 meses después del condicionamiento (**Figura 30, D**). El mismo patrón de congelación se observó cuando el condicionamiento se llevó a cabo 48 horas previas a la inducción de la isquemia cerebral (**Figura 30, E-F**). Estos resultados indican el impacto negativo de la isquemia cerebral en la capacidad de recuperación de memorias remotas, independientemente del momento en que éstas se adquirieron (48h antes o 7 días después de la isquemia).

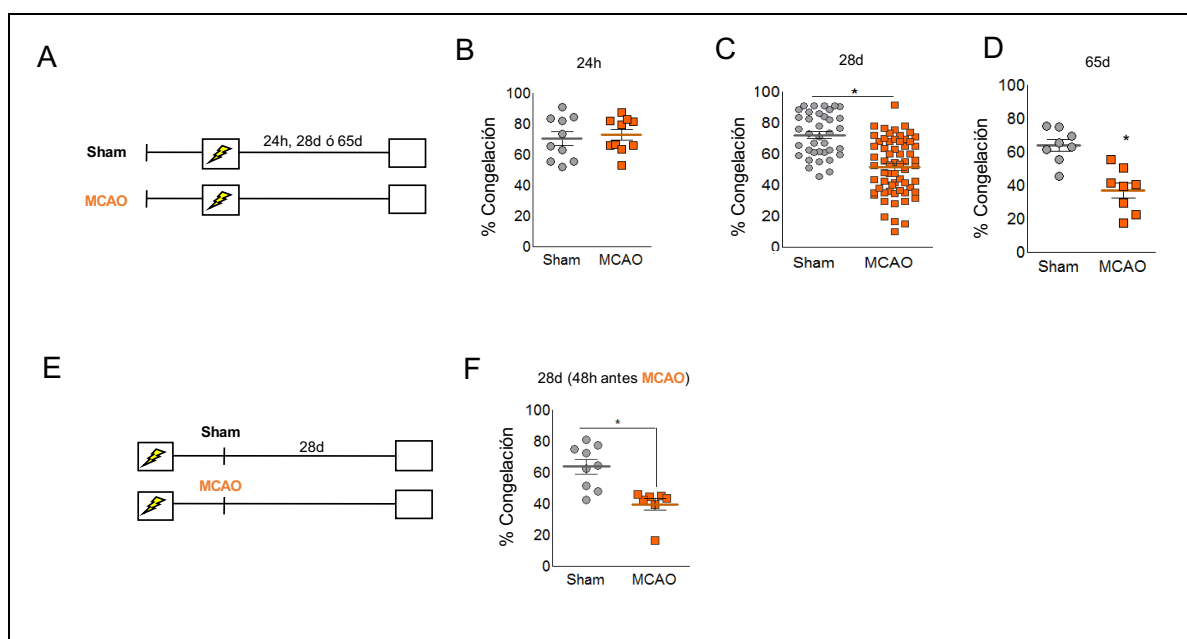


Figura 30. La isquemia cerebral altera la memoria contextual dependiente del hipocampo. (A) Protocolo experimental para los paneles (B-D). (B-D) Capacidad de retención cognitiva tras isquemia cerebral calculada como % de respuesta de congelación 24h ($p > 0.05$ vs. sham; Sham, $n=11$; MCAO, $n=10$), 28 días ($*p < 0.05$ vs. sham; Sham, $n=37$ y MCAO, $n=63$) y 65 días tras el condicionamiento ($0.6\text{mA} \times 3$) ($*p < 0.05$ vs. sham; Sham, $n=8$ y MCAO, $n=8$). (E) Protocolo experimental para el panel F. (F) Capacidad de retención tras aplicar un condicionamiento ($0.6\text{mA} \times 3$) 48h previas a la cirugía ($*p < 0.05$ vs. sham; Sham, $n=9$ y MCAO, $n=7$). Estadística: (B-D y F) test no paramétrico de Mann-Whitney.

Dado que el grado de retención de una nueva memoria puede variar dependiendo tanto de la intensidad como de la cantidad de repeticiones en las que se presente el nuevo estímulo durante su aprendizaje, a continuación se procedió a analizar el efecto de la isquemia cerebral en la capacidad de retención de nuevas memorias establecidas mediante diferentes grados de intensidad (por ejemplo, empleando un protocolo de condicionamiento débil o fuerte). Mientras que, con el protocolo de condicionamiento débil, los animales isquémicos presentaron una menor respuesta de congelación que los animales sham (Figura 31, B), no se observaron diferencias 28 días después del condicionamiento entre grupos cuando se utilizó el protocolo de condicionamiento fuerte (Figura 31, B). Sin embargo, incluso con el protocolo de condicionamiento fuerte, la isquemia cerebral produjo

una reducción en la capacidad de retención de las nuevas memorias 2 meses después del condicionamiento (Figura 31, B-C), lo que podría indicar que la isquemia cerebral produce un deterioro cognitivo progresivo en el tiempo.

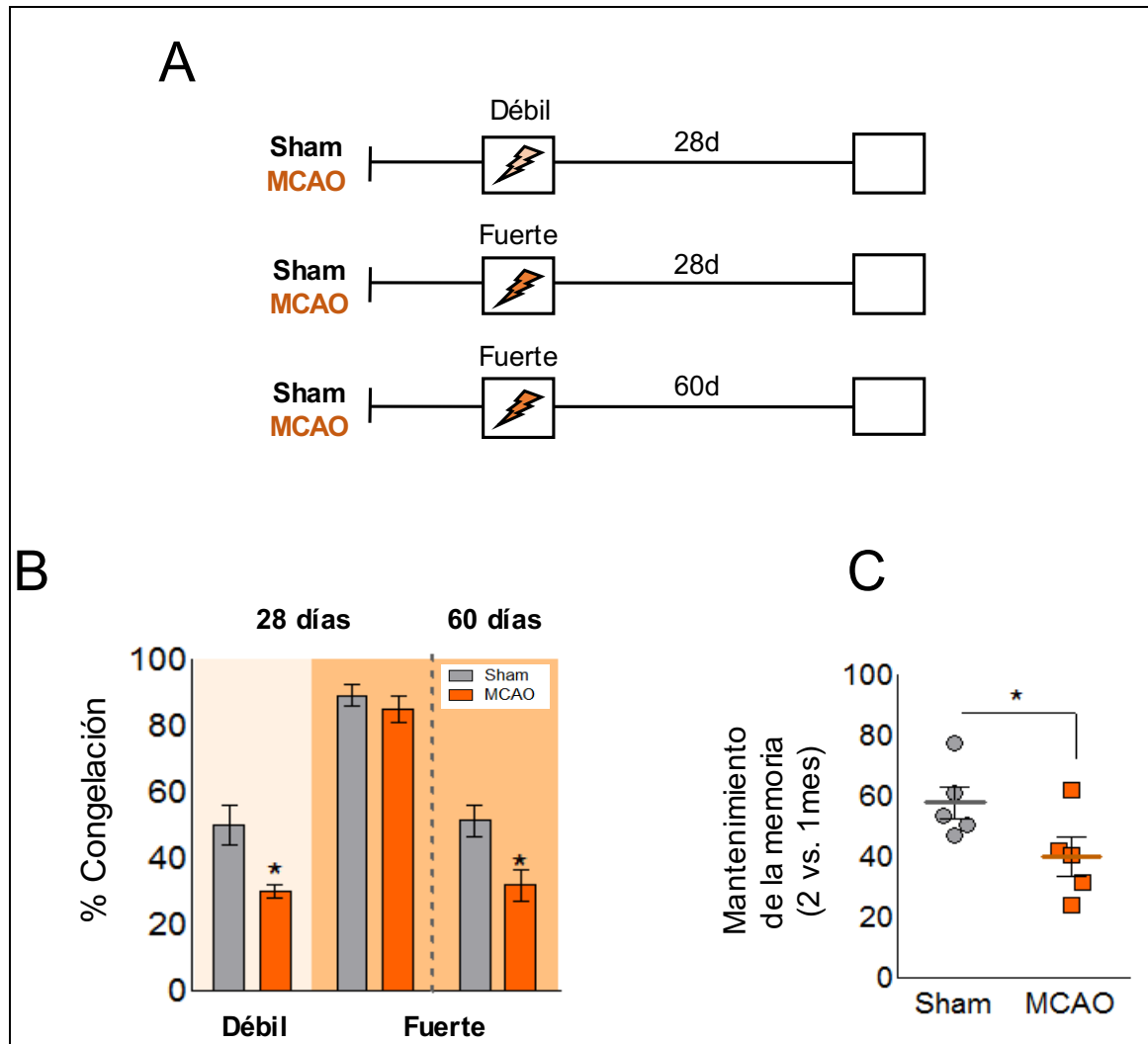


Figura 31. Modulación de la respuesta de congelación tras isquemia en función de la intensidad del condicionamiento. (A) Protocolo experimental para los paneles (B y C). (B) Porcentaje de respuesta de congelación en los animales sham e isquémicos tras el empleo de un protocolo de condicionamiento débil (0.4mAx2; columnas de la izquierda; panel naranja claro; * $p < 0.05$ vs. sham; Sham, $n = 7$ y MCAO, $n = 7$) o fuerte (0.8mAx5; columnas de la izquierda; panel naranja oscuro; $p > 0.05$ vs. sham; Sham, $n = 5$ y MCAO, $n = 5$; columnas de la derecha; panel naranja oscuro; * $p < 0.05$ vs. sham; Sham, $n = 5$ y MCAO, $n = 5$). La capacidad de recuerdo medida como % de congelación se analizó en cada caso 28 días y 2 meses después del condicionamiento, respectivamente. (C) Mantenimiento de la memoria 2 meses después del entrenamiento con el protocolo de condicionamiento fuerte. Los datos representan el % de congelación observado a los 2 meses versus 1 mes tras el condicionamiento (* $p < 0.05$ vs. sham; Sham, $n = 5$ y MCAO, $n = 5$). Estadística: (B y C) test no paramétrico de Mann-Whitney.

5.1.1.2 Alteraciones de la memoria espacial tras isquemia cerebral

Dado que la isquemia estaba produciendo alteraciones en la memoria de tipo contextual, se quiso comprobar si igualmente la memoria de tipo espacial se encontraba afectada en nuestro modelo de isquemia permanente. Para ello, 7 días después de la cirugía y durante 7 días consecutivos, los animales isquémicos y sham se entrenaron en el laberinto de Barnes y, 28 días después, se analizó su capacidad de retención. Durante la fase de entrenamiento, ambos grupos se comportaron de manera similar en términos de distancia total recorrida y velocidad (Figura 32, A-B). Igualmente, la isquemia no produjo interferencias en la capacidad de aprendizaje de los animales a lo largo del entrenamiento, como muestra la progresiva reducción en el tiempo empleado por ambos grupos en localizar la caja de escape e introducirse en ella (Figura 32, C-D).

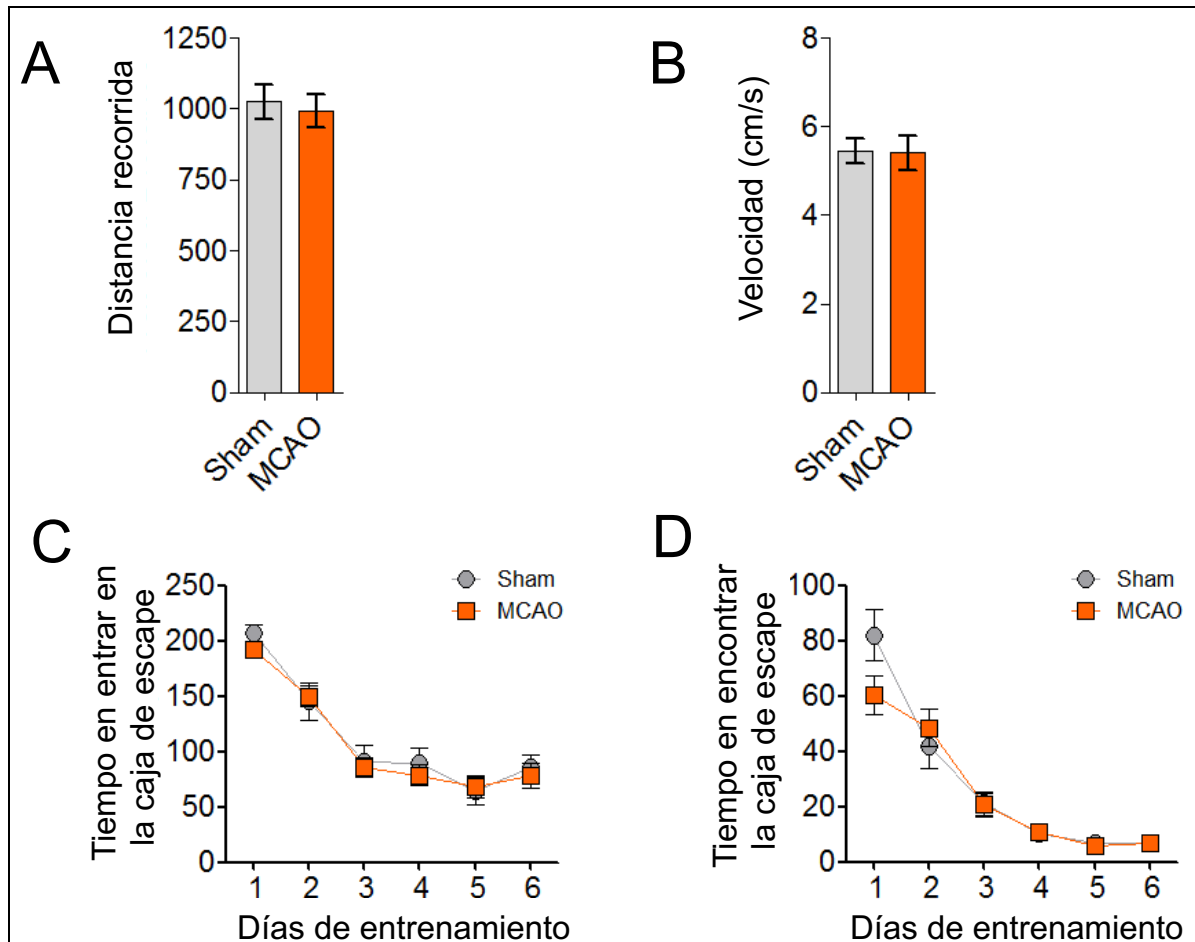


Figura 32. La isquemia cerebral no altera el aprendizaje de tipo espacial. (A) Distancia total recorrida (en cm) y (B) velocidad media (en cm/s) mostrada por los animales sham e isquémicos durante la fase de entrenamiento en el laberinto de Barnes (Sham, n=12; MCAO, n=19). Tiempo empleado en entrar (C) o encontrar (D) la caja de escape (en segundos) durante la fase de entrenamiento en el test del laberinto de Barnes. Se identificaron interacciones significativas tanto respecto al tiempo en entrar ($F_{(5,170)} = 62.79$; $p < 0.0001$) (C), como en encontrar la caja de escape ($F_{(5,190)} = 67.18$; $p < 0.0001$; Sham, n=12; MCAO, n=19) (D). No se identificaron diferencias entre los grupos sham e isquémicos.. Estadística: (A y B) test no paramétrico de Mann-Whitney y (C y D) ANOVA de dos vías no paramétrico seguido de un post-test de Bonferroni.

Sin embargo, 28 días tras finalizar la fase de entrenamiento, al analizar tanto el tiempo empleado en el cuadrante objetivo (Figura 33, C) o alrededor del agujero objetivo (Figura 33, D), los resultados mostraron una reducción en la capacidad de retención de las nuevas memorias espaciales adquiridas en los animales isquémicos en relación al grupo sham.

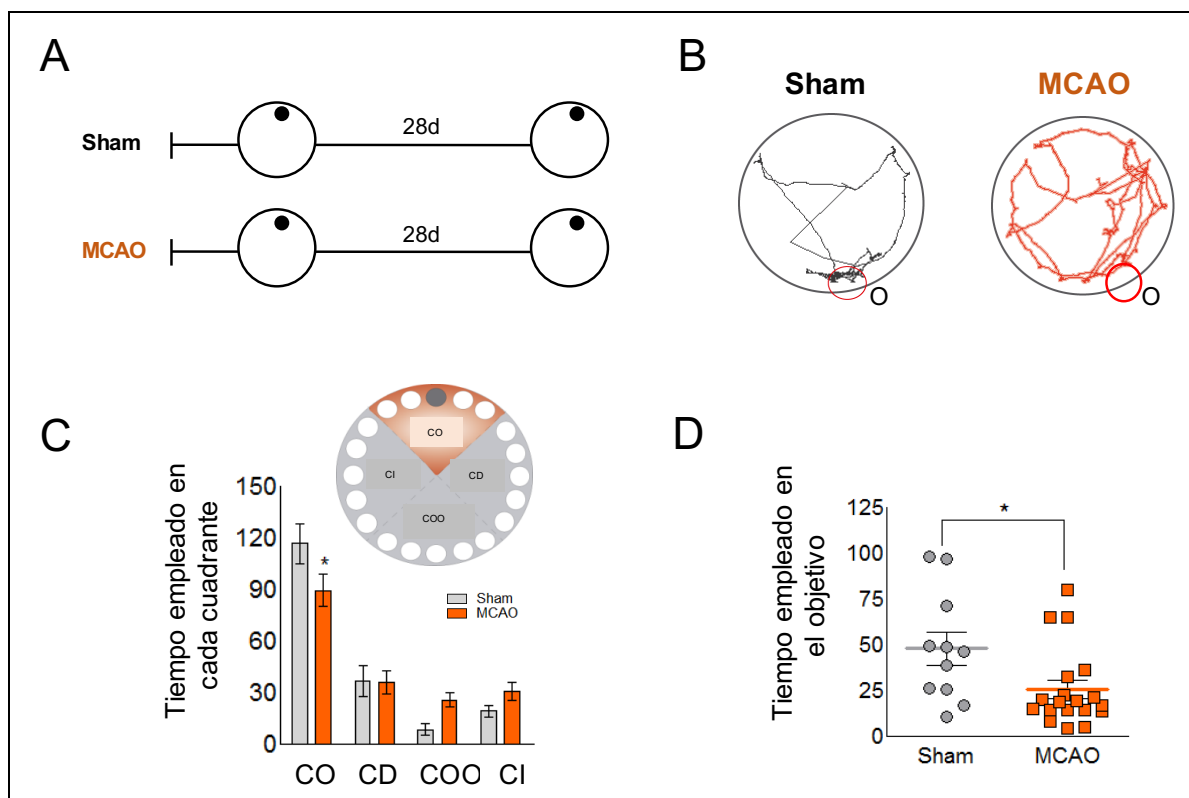


Figura 33. La isquemia cerebral altera la memoria espacial dependiente del hipocampo. (A) Protocolo experimental para el test del laberinto de Barnes de los paneles (B-D). (B) Trazados del comportamiento de búsqueda de los animales isquémicos y sham el día del test. (C-D) Tiempo empleado por los animales sham e isquémicos en cada cuadrante (C) o alrededor del agujero objetivo (D) en el laberinto de Barnes 28 días después del entrenamiento. En (C), se encontró una interacción significativa entre los cuadrantes y la cirugía ($F(3,116) = 3.50$; $p = 0.0178$; Sham, $n = 12$; MCAO; $n = 19$; $*p < 0.05$ vs. sham CO; Bonferroni post-test). En (D), $*p < 0.05$ vs. sham. CO: Cuadrante objetivo, CD: Cuadrante derecho, CI: Cuadrante izquierdo y CCO: Cuadrante contrario al objetivo. Estadística: (C) ANOVA de dos vías no paramétrico seguido de un post-test de Bonferroni; (D) test no paramétrico de Mann-Whitney.

5.1.1.3 Afectación de la actividad hipocampal tras isquemia cerebral

Para explorar el grado de dependencia con el hipocampo de los diferentes tipos de memorias estudiadas tras isquemia cerebral (Lehmann et al., 2007), se analizó la capacidad de retención de memorias remotas en animales sham y sometidos a isquemia cerebral tras inactivar previamente el hipocampo mediante la infusión de tetrodotoxina (TTX) (Figura 34, A). Veinticuatro horas después de analizar la capacidad de retención que muestran los ratones 28 días tras el condicionamiento,

tanto los animales sham como isquémicos recibieron una infusión bilateral en el hipocampo dorsal, de vehículo o TTX y, 3 horas después, se volvió a analizar su capacidad de retención. La administración de TTX redujo drásticamente, tanto en el grupo sham como isquémico, la capacidad de recuerdo de las memorias adquiridas en comparación con los grupos tratados con vehículo (**Figura 34, B**). Estos resultados indican la necesidad de la activación hipocampal para la recuperación de memorias previamente almacenadas, incluido el contexto de la isquemia cerebral experimental.

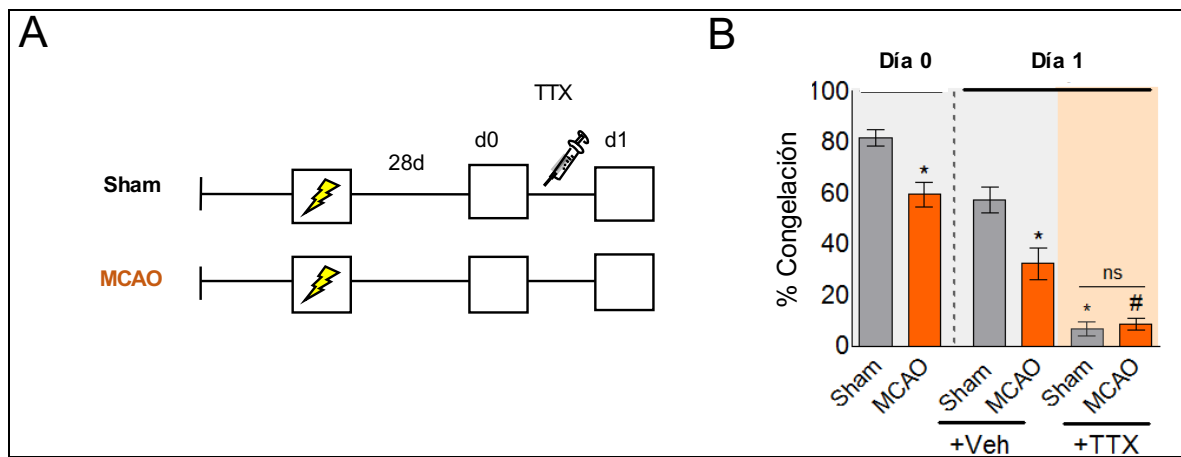


Figura 34. Inhibición del recuerdo tras inactivación del hipocampo con tetrodotoxina (TTX). (A) Protocolo experimental del panel (B). (B) Estudio del recuerdo en los animales sham e isquémicos 28 días después del test CMC (0,6mA \times 3) (* p <0.05 vs. sham; Sham, n =9 y MCAO, n =13). A las 24h, y 3h después de la infusión bilateral de TTX o vehículo se volvió a analizar el recuerdo, medido como el % de respuesta de congelación (Sham vehículo, n =4; MCAO vehículo, n =5; Sham TTX, n =5 y MCAO TTX, n =8; * p <0.05 vs. sham vehículo; # p <0.05 vs. MCAO vehículo; ns, no significativo). Estadística: (B, día 0) test no paramétrico de Mann-Whitney y (B, día 1) ANOVA de dos vías no paramétrico seguido de un post-test de Bonferroni.

Uno de los paradigmas en el proceso de la recuperación de la información almacenada en los circuitos hipocampales consiste en la reactivación específica de las neuronas implicadas en el aprendizaje en el momento del recuerdo (Josselyn, 2010). Para estudiar la influencia de la isquemia cerebral en la activación de dichas neuronas, se llevó a cabo un mapeo hipocampal de la expresión del marcador c-

Fos tras la fase de recuerdo en animales sham e isquémicos sometidos previamente a CMC. Noventa minutos tras la fase de recuerdo, los animales sham sometidos a condicionamiento mostraron un mayor número de neuronas c-Fos⁺ en diferentes regiones hipocampales, tales como CA1, CA3 y GD, en comparación con los animales sham sin condicionamiento (**Figura 35, A**). Sin embargo, tanto en el hipocampo ipsi- como contralesional, los animales isquémicos mostraron una menor activación neuronal respecto al grupo sham (**Figura 35, B**), sugiriendo la interferencia de la isquemia cerebral en la compleción de patrones durante la fase de recuerdo (Fig. 35; inducción de células c-Fos⁺ vs. sham sin condicionamiento: sham: 3.79 ± 0.43 ; MCAO ipsilesional: 1.59 ± 0.29 ; MCAO contralesional: 1.51 ± 0.36). En conjunto, todos estos datos muestran que, tras la isquemia, se desarrolla a largo plazo un deterioro cognitivo dependiente del hipocampo.

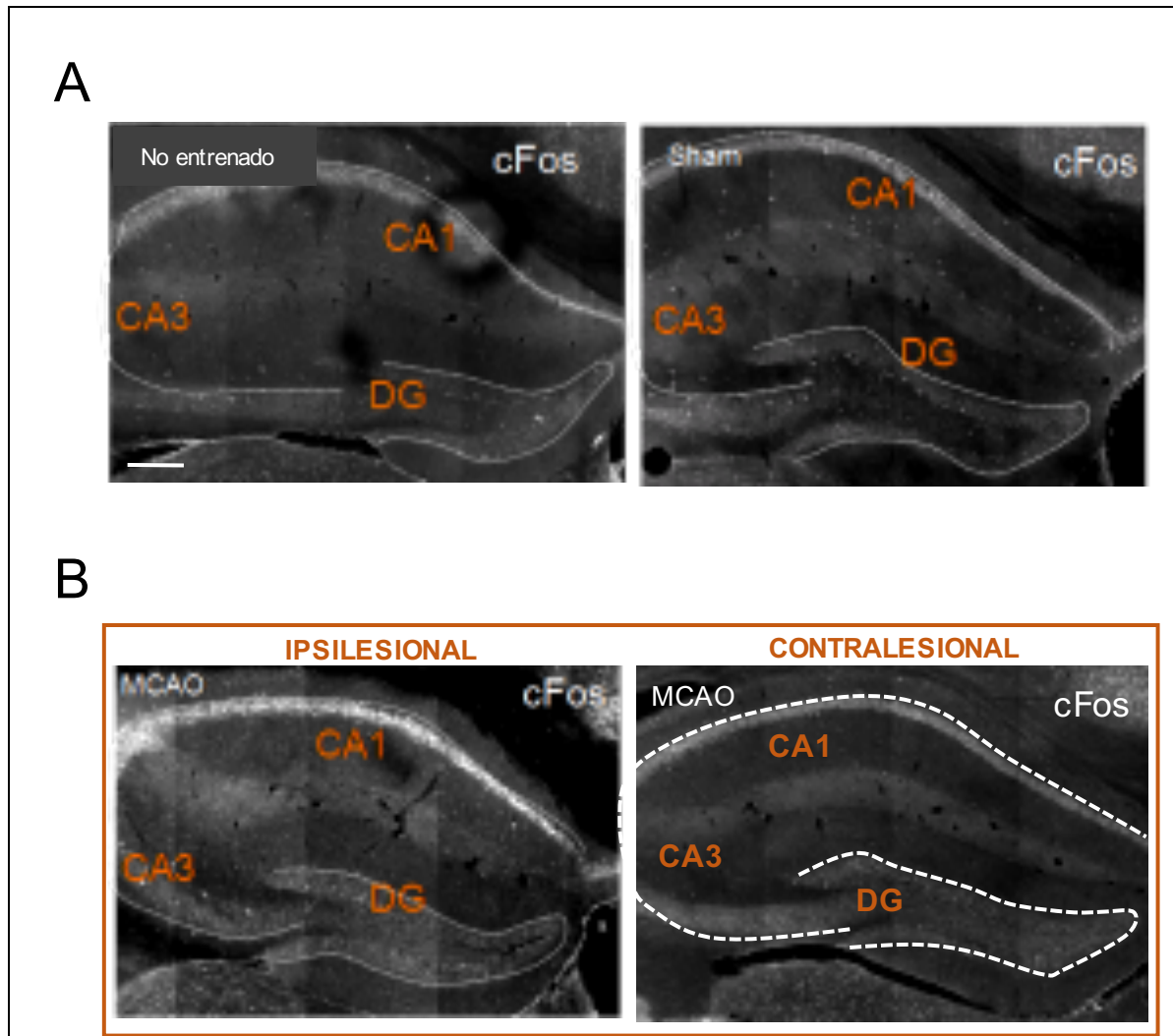


Figura 35. Patrón diferencial de activación de c-Fos en hipocampo durante el recuerdo. (A) Imágenes representativas del marcador c-Fos (gris) en el hipocampo de animales sin entrenar (izquierda) y sham (derecha). (B) Imágenes representativas del marcador c-Fos (gris) en el hipocampo ipsilesional (izquierda) y contralesional (derecha) de animales isquémicos. Escala = 200µm. En todos los casos el marcaje de c-Fos representa el estado de activación neuronal 90 minutos después de la fase de recuerdo tras la aplicación de un test del condicionamiento al miedo contextual 28 días antes.

5.1.2 Estudio de la respuesta neurogenica hipocampal inducida tras isquemia cerebral experimental

Hasta el momento se ha demostrado que nuestro modelo de isquemia cortical permanente producía un deterioro cognitivo progresivo el cual era dependiente del hipocampo. Tras descartar por imagen (RM) e histología (tinción de Nissl) que

estos déficits pudieran ser debidos a una evolución con el tiempo del área cerebral dañada, se decidió estudiar las posibles alteraciones neuroanatómicas hipocampales producidas por la isquemia y que pudiesen explicar de los déficits observados.

5.1.2.1 Alteraciones anatómicas hipocampales tras isquemia cerebral: relación con el deterioro cognitivo

Tras llevar a cabo un análisis global de la morfología y el volumen hipocampal 1 y 2 meses tras isquemia, no se observaron diferencias entre grupos (Figura 36, B y D).

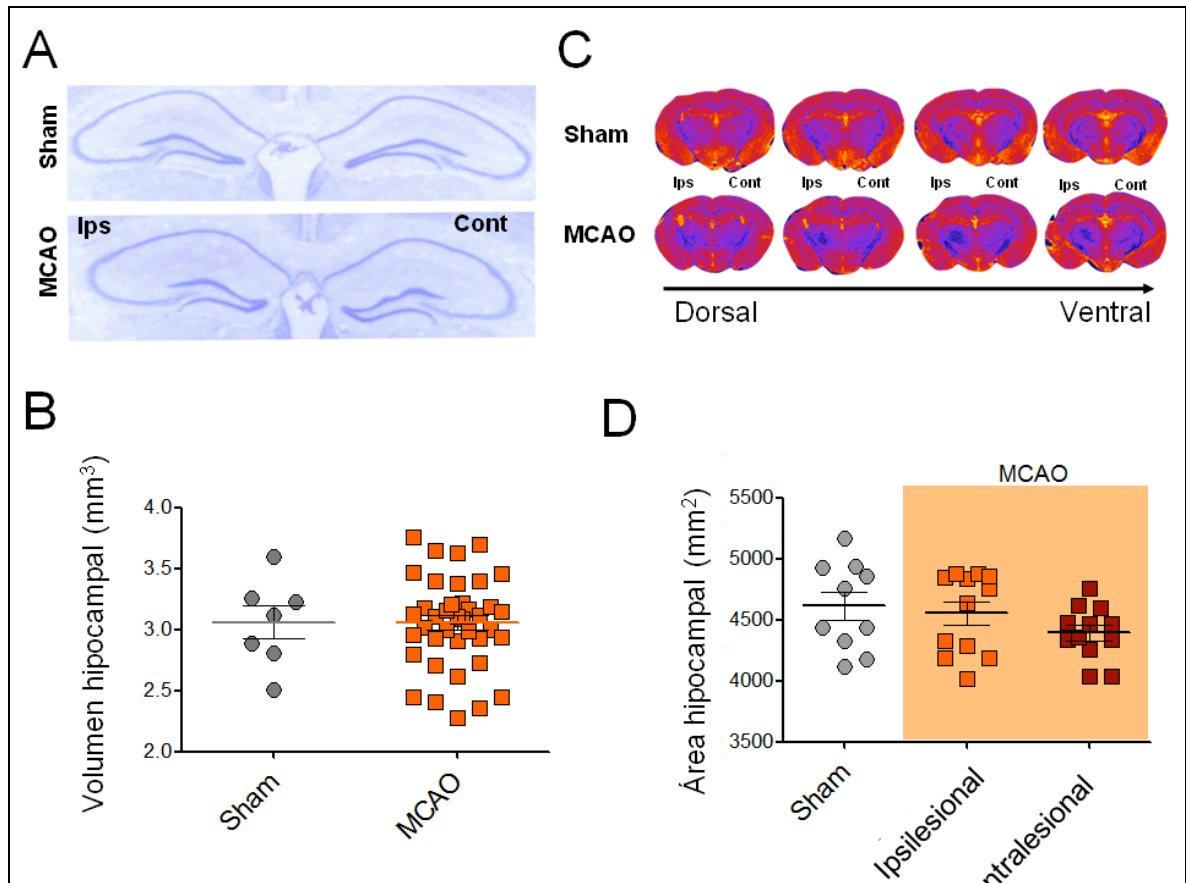


Figura 36. La isquemia cerebral no modifica el volumen ni el área hipocampal global. (A-B) Imágenes representativas (A) y cuantificación (B) del volumen hipocampal en los animales sham e isquémicos por tinción de Nissl y Cavalieri 1 mes después de la cirugía (n=7-36 animales/grupo). **(C-D)** Imágenes representativas (C) y cuantificación (D) del área hipocampal en los cerebros fijados de los animales sham e isquémicos por RMN *ex-vivo* (n=10-12 animales/grupo). Estadística: (B y C) test no paramétrico de Mann-Whitney.

Sin embargo, se observó un incremento del volumen de la capa granular del GD en el grupo de animales isquémicos respecto a sus controles (**Figura 37, A**). Además, en los animales isquémicos, dicho incremento se correlacionó negativamente con la respuesta de congelación mostrada previamente durante la fase de recuerdo (**Figura 37, B**). Estos resultados indicaban una correlación entre el volumen de la CG y el deterioro cognitivo en los animales isquémicos.

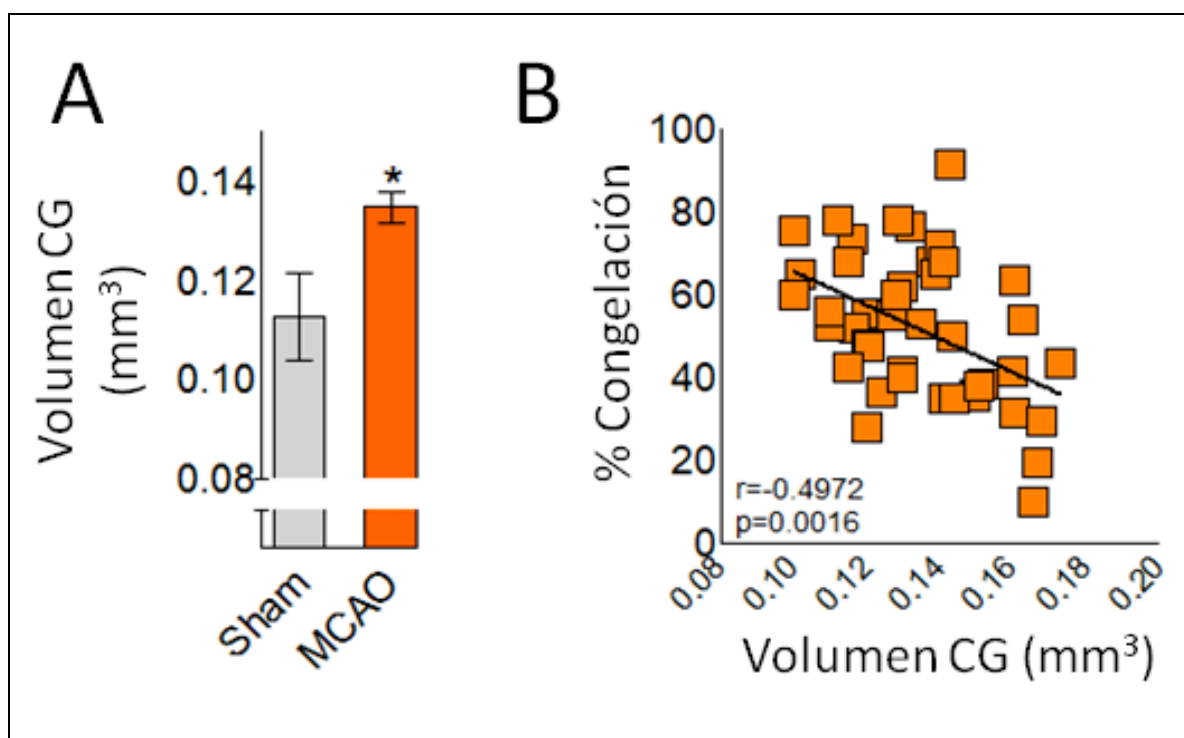


Figura 37. Las alteraciones volumétricas de la capa granular hipocampal tras isquemia se correlacionan con la capacidad de recuerdo. (A) Cuantificación de la capa granular del giro dentado por estimación de Cavalieri en secciones cerebrales teñidas con tinción de Nissl en animales sham e isquémicos 35 días después de la cirugía (Sham, $n=10$; MCAO, $n=43$) (* $p<0.05$ vs. sham). **(B)** Correlación negativa entre el volumen de la capa granular y el % de congelación observado en los animales isquémicos. En el gráfico se muestra la regresión lineal (MCAO, $n=43$; Spearman $r=-0.4972$, $p=0.0016$). Estadística: **(A)** test t de Student no pareado seguido de un test de dos colas Mann-Whitney; **(B)** Análisis de regresión lineal y test de correlación de Spearman.

5.1.2.2 Perfil temporal de la respuesta neurogénica hipocampal: relación con el deterioro cognitivo asociado tras isquemia cerebral

Durante la etapa adulta se generan nuevas neuronas en la ZSG del GD de manera continuada, proceso conocido como neurogénesis hipocampal adulta. Una vez integradas en los circuitos hipocampales, estas nuevas neuronas juegan un papel clave en el almacenamiento de las memorias (Altman y Das, 1965; Kempermann et al., 1997; van Praag et al., 1999). La alteración de la neurogénesis hipocampal se ha descrito en distintos modelos experimentales de daño cerebral agudo. Esta respuesta neurogénica alterada supone graves consecuencias para la correcta

función hipocampal, tal como se observa en diferentes patologías como la epilepsia o esquizofrenia (Zhao et al., 2008).

En el contexto de la isquemia cerebral, se ha observado una inducción de la neurogénesis hipocampal en diferentes modelos de isquemia cortical (Arvidsson et al., 2001 y Kluska et al., 2005). Dado que las alteraciones neurogénicas pueden afectar el tamaño de la CG del GD (Cancino et al., 2013) y que la integración de las nuevas neuronas generadas interfiere en la recuperación de las memorias previamente adquiridas (Akers et al., 2014), se procedió a estudiar si la isquemia cerebral estaba produciendo una respuesta neurogénica aberrante que pudiese estar implicada en el deterioro cognitivo observado.

En primer lugar, la isquemia cerebral produjo un incremento significativo del número de células proliferativas Ki67⁺ y de nuevas neuronas inmaduras (células DCX⁺), tanto en el hipocampo ipsi- como contralesional, 7 y 14 días tras el daño isquémico (Figura 38, A). Dichas diferencias se mantuvieron incluso 21 y 35 días después de la cirugía (Figura 38, A). Como resultado de esta constante potenciación neurogénica, encontramos finalmente un mayor número de nuevas neuronas maduras integradas 65 días tras la isquemia en el grupo de animales isquémicos respecto al grupo sham, determinado mediante el número de neuronas Calbindina⁺ o NeuN⁺ que colocalizaban con BrdU (Figura 38, C).

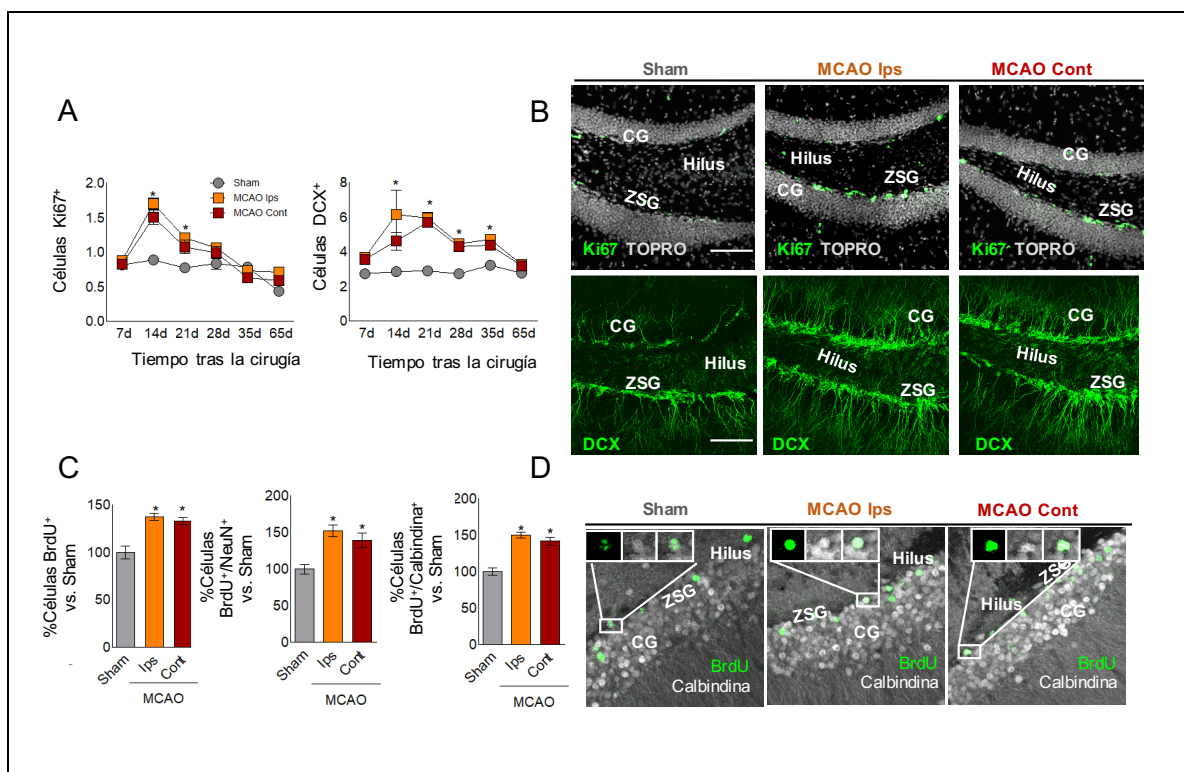


Figura 38. Potenciación de la neurogénesis hipocampal tras isquemia cerebral. (A) Perfil temporal de la cuantificación de las células Ki67⁺ proliferativas (izquierda) y de neuronas inmaduras DCX⁺ (derecha) en los animales sham e isquémicos (en el GD ipsi- y contralesional). Los datos se expresan como células por 1000µm². Se identificó una interacción significativa entre el tiempo tras isquemia y el número de células Ki67⁺ proliferativas ($F_{(10,81)} = 6.54$; $p < 0.0001$). Se observaron diferencias significativas entre la isquemia ($F_{(2,81)} = 26.21$; $p < 0.0001$) y el tiempo después de la cirugía ($F_{(5,81)} = 49.97$; $p < 0.0001$) (* $p < 0.05$ vs. sham; Sham, $n = 4-10$; MCAO ipsilesional, $n = 5-13$ and MCAO contralesional, $n = 5-13$; Bonferroni post-test). Así mismo, se identificó una interacción significativa entre el tiempo tras isquemia y el número de células DCX⁺ ($F_{(10,134)} = 2.28$; $p = 0.0165$). Se observaron diferencias significativas entre la isquemia ($F_{(2,134)} = 41.33$; $p < 0.0001$) y el tiempo después de la cirugía ($F_{(5,134)} = 8.58$; $p < 0.0001$) (* $p < 0.05$ vs. sham; sham, $n = 5-24$; MCAO ipsilesional, $n = 5-40$ y MCAO contralesional, $n = 5-20$; Bonferroni post-test). (B) Imágenes representativas de las células Ki67⁺ (arriba) y DCX⁺ (abajo) en los grupos sham e isquémicos 35 días después de la cirugía. Se utilizó TOPRO-3 como marcador nuclear. (C) Cuantificación del número de células BrdU⁺ (C izquierda) y nuevas neuronas BrdU⁺/NeuN⁺ (centro) o BrdU⁺/Calbindina⁺ (derecha) 65 días tras la cirugía en los grupos sham e isquémicos. La administración de BrdU (100mg/Kg) se realizó durante la segunda y tercera semana después de la cirugía. Los datos están expresados como % respecto al grupo sham (* $p < 0.05$ vs sham; $n = 4$ para ambos grupos Sham y MCAO). (D) Imágenes representativas de las nuevas neuronas. Zona subgranular: ZSG y capa granular: CG. Escala = 100µm. Estadística: (A) ANOVA de dos vías no paramétrico seguido de un post-test de Bonferroni; (C) ANOVA de una vía no paramétrico seguido de un post-test de Kruskal-Wallis.

A continuación, se procedió a evaluar la relación entre el incremento de la neurogénesis hipocampal y el deterioro cognitivo producido por la isquemia cerebral. Se detectó una correlación negativa entre los niveles de neuroblastos

(DCX⁺) y la respuesta de congelación (**Figura 39, A**), lo que sugiere que la neurogénesis inducida por la isquemia provoca un empeoramiento del deterioro cognitivo. Además, se identificó una correlación positiva entre el volumen de la CG y los niveles de neuroblastos en el grupo de animales isquémicos (**Figura 39, B**). Todos estos resultados ponen de manifiesto la relación entre la estimulación de la respuesta neurogénica producida por la isquemia cerebral y el deterioro cognitivo asociado.

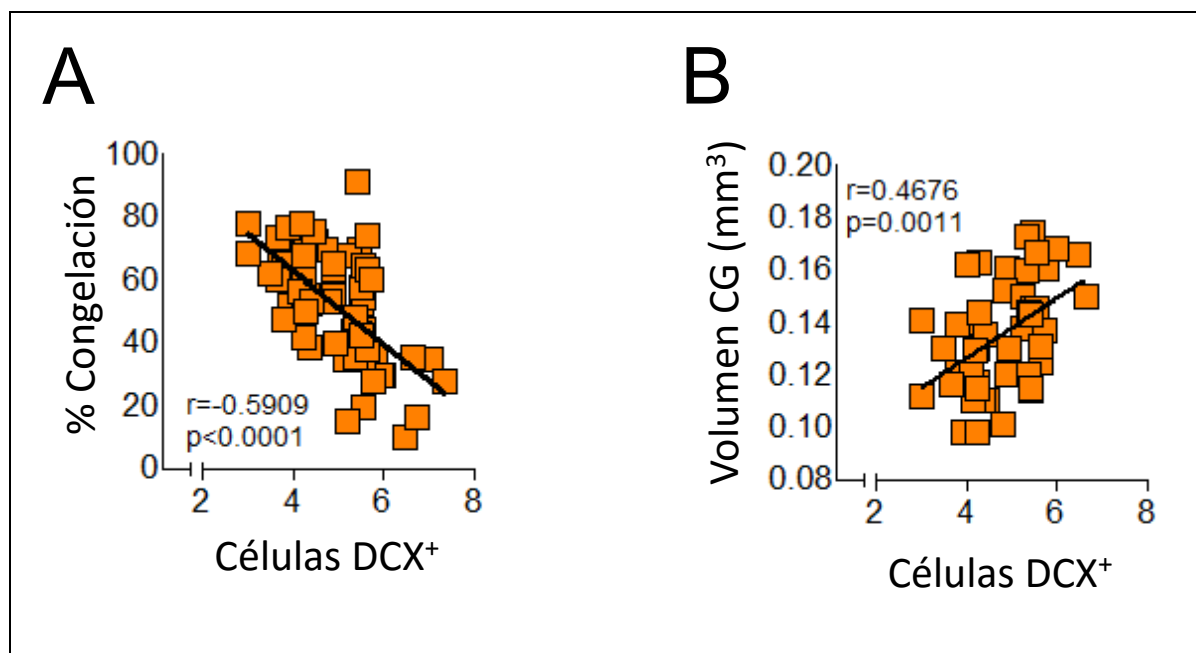


Figura 39. Correlación entre el incremento de la neurogénesis hipocampal y el deterioro cognitivo tras isquemia cerebral. (A) Correlación negativa entre el número de neuronas nuevas inmaduras (DCX⁺) y la respuesta de congelación en animales isquémicos 35 días tras la cirugía (MCAO, n=66; Spearman $r=-0.5909$, $p<0.0001$). (B) Correlación positiva entre el número de neuronas nuevas inmaduras (DCX⁺) y el volumen de la capa granular del GD en los animales isquémicos (MCAO, n=46; Spearman $r=0.476$, $p=0.0011$). Estadística: (A y B) Análisis de regresión lineal y test de correlación de Spearman.

5.1.3 Exacerbación del deterioro cognitivo asociado a la isquemia cerebral tras sobreestimulación de la neurogénesis hipocampal

Los resultados previos ponían de manifiesto la relación positiva entre los niveles de neurogénesis tras isquemia y las alteraciones cognitivas. Para reforzar estos resultados, a continuación se llevaron a cabo diferentes intervenciones para corroborar si el deterioro cognitivo tras isquemia cerebral se potenciaba tras una sobreestimulación de la respuesta neurogénica.

5.1.3.1 Efecto del aumento de neurogénesis inducido por ejercicio físico voluntario sobre el deterioro cognitivo tras la isquemia cerebral

Una de las estrategias clásicas empleadas para incrementar la neurogénesis hipocampal en roedores consiste en el *acceso voluntario a correr en una rueda*. Con el fin de potenciar la neurogénesis, 7 días tras la isquemia cerebral se dio acceso a una rueda a los animales isquémicos y sham. Independientemente de la isquemia, a estos grupos se les denominará *corredores*. A los correspondientes grupos controles se les dio acceso a la rueda; sin embargo, ésta permaneció permanentemente cerrada. A estos grupos se les denominará *sedentarios*. Veintiocho días tras la potenciación de la neurogénesis, los grupos de los *corredores* respecto a los controles *sedentarios* presentaron mayores niveles de células proliferativas Ki67⁺ así como de neuroblastos, tanto en el grupo de los *corredores* sham como los *corredores* isquémicos (Figura 40, B y D) y (Figura 41, C y D).

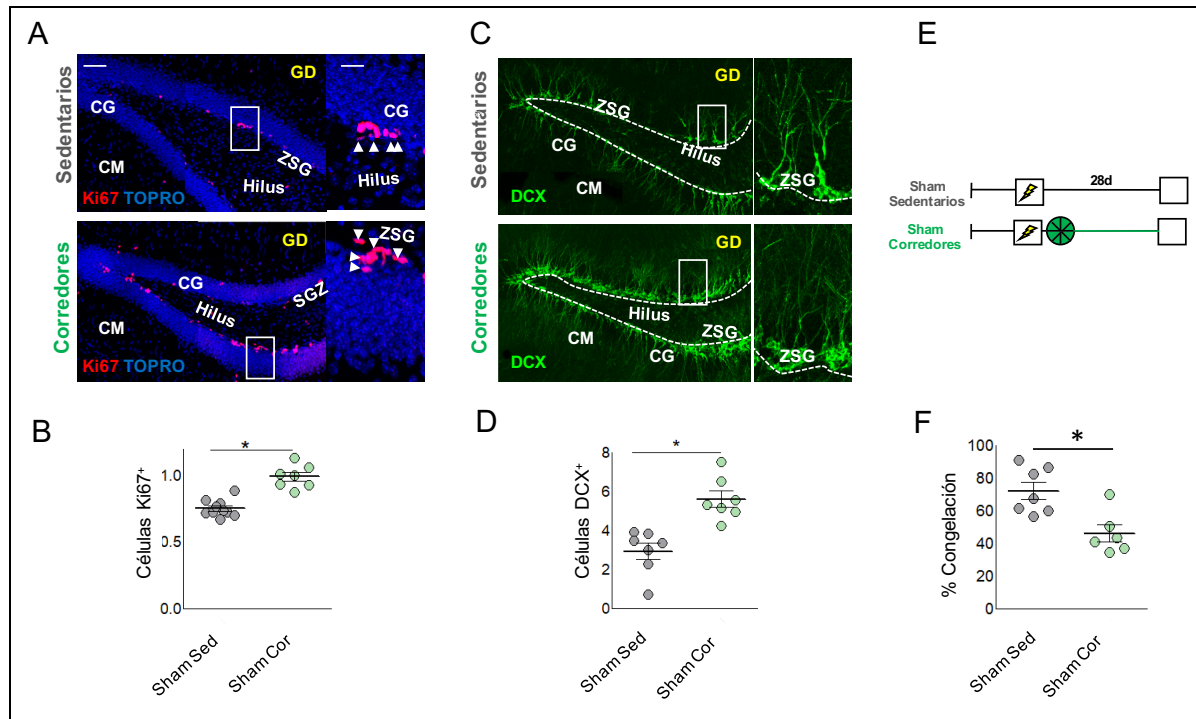


Figura 40. El incremento de la neurogénesis hipocámpal tras el ejercicio físico voluntario potencia el deterioro cognitivo. (A-B) Imágenes representativas de las células proliferativas Ki67⁺ (A) y su cuantificación (B) en los grupos sham sedentarios y sham corredores (*p<0.05 vs sham Sed; n= 7-8 para ambos grupos Sham Sedentarios y Sham Corredor). **(C-D)** Imágenes representativas de las células DCX⁺ (C) y su cuantificación (D) en los grupos sham sedentarios y sham corredores (*p<0.05 vs sham Sed; n= 7-8 para ambos grupos Sham Sedentarios y Sham Corredor). **(E)** Protocolo experimental para panel (F). **(F)** Porcentaje de congelación de los animales sham sedentarios y sham corredores tras someterles al test CMC (0,6mAx3). Giro dentado: GD, zona subgranular: ZSG, capa granular: CG, capa molecular: CM. Escala = 100µm; magnificación = 20µm. Estadística: (B, D y F) test de dos colas Mann-Whitney.

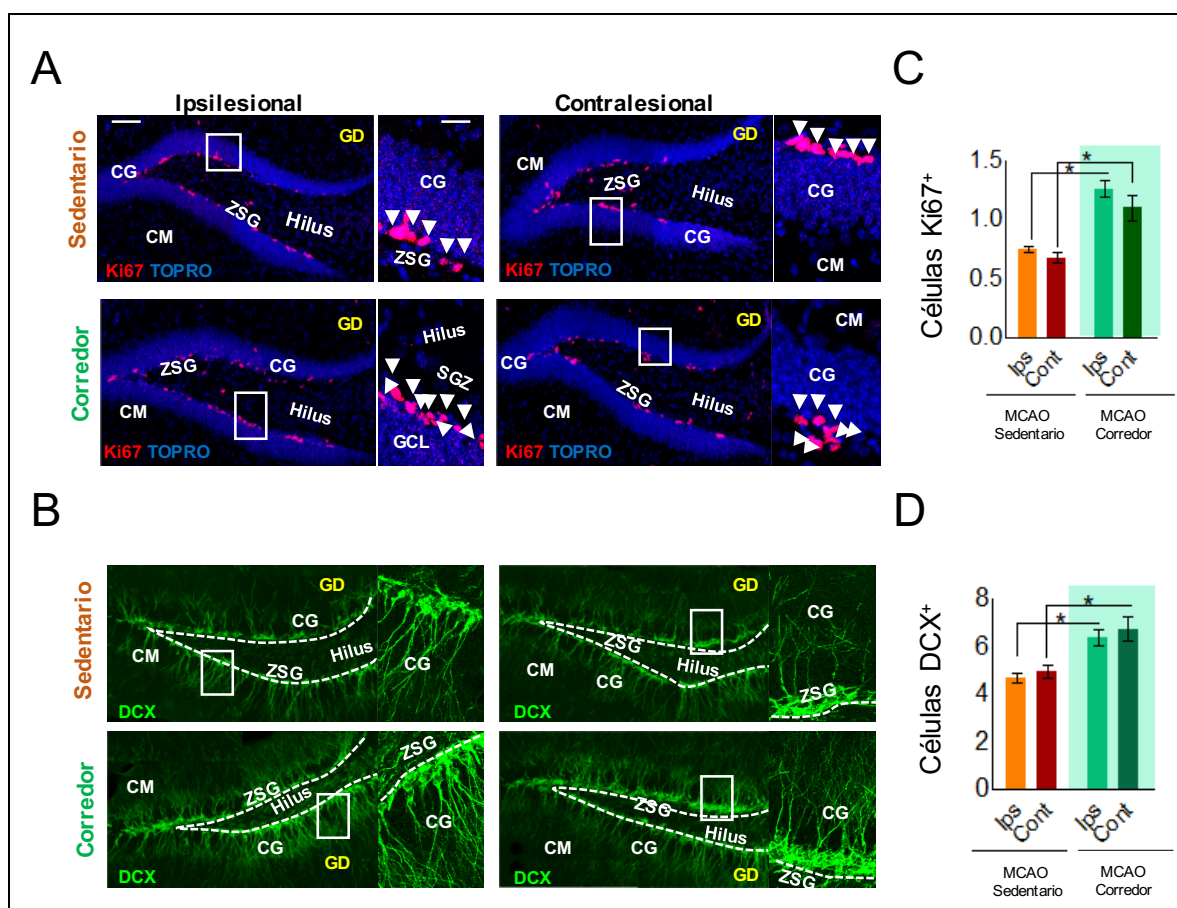


Figura 41. Incremento de la neurogénesis hipocampal tras ictus por ejercicio físico voluntario. (A-B) Imágenes representativas de las células proliferativas Ki67⁺ en los hipocámpos ipsi- y contralesional (A) y su cuantificación (B) en los animales isquémicos sedentarios y corredores. (C-D) Imágenes representativas de las células DCX⁺ en los hipocámpos ipsi- y contralesional (C) y su cuantificación (D) en los animales isquémicos sedentarios y corredores. Se identificó una interacción significativa entre el efecto de correr y el número de células Ki67⁺ ($F_{(1,40)}=60.72$; $p<0.0001$) y neuronas inmaduras DCX⁺ ($F_{(1,40)}=30.33$; $p<0.0001$) en los grupos MCAO sedentarios y corredores en los hemisferios ipsi- y contralesional (* $p<0.05$ vs. MCAO sedentarios; MCAO sedentarios, $n=13$ y MCAO corredores, $n=9$; Bonferroni post-test). TOPRO se empleó como marcador nuclear. Giro dentado: GD, zona subgranular: ZSG, capa granular: CG, capa molecular: CM. Escala = 100 μ m; magnificación = 20 μ m. Estadística: (C y D) ANOVA de dos vías no paramétrico seguido de un post-test de Bonferroni.

A continuación, para comprobar el efecto de la potenciación de la respuesta neurogénica tras isquemia sobre el deterioro cognitivo, se llevó a cabo la evaluación de la capacidad de retención de memorias previamente adquiridas tras ejercicio físico voluntario. Reforzando nuestra hipótesis, cuatro semanas después de someter a los animales al test del CMC, tanto en el grupo de los *corredores*

sham (**Figura 40, E-F**), como los *corredores* isquémicos con libre acceso para correr (**Figura 42, A-B**), desarrollaron un empeoramiento en la capacidad de recuerdo de la memoria previamente adquirida respecto a sus respectivos controles *sedentarios*. Apoyando nuestra predicción, los animales mostraron el mismo comportamiento cuando se les sometió al paradigma del condicionamiento al miedo contextual de tipo incidental (**Figura 42, C-D**).

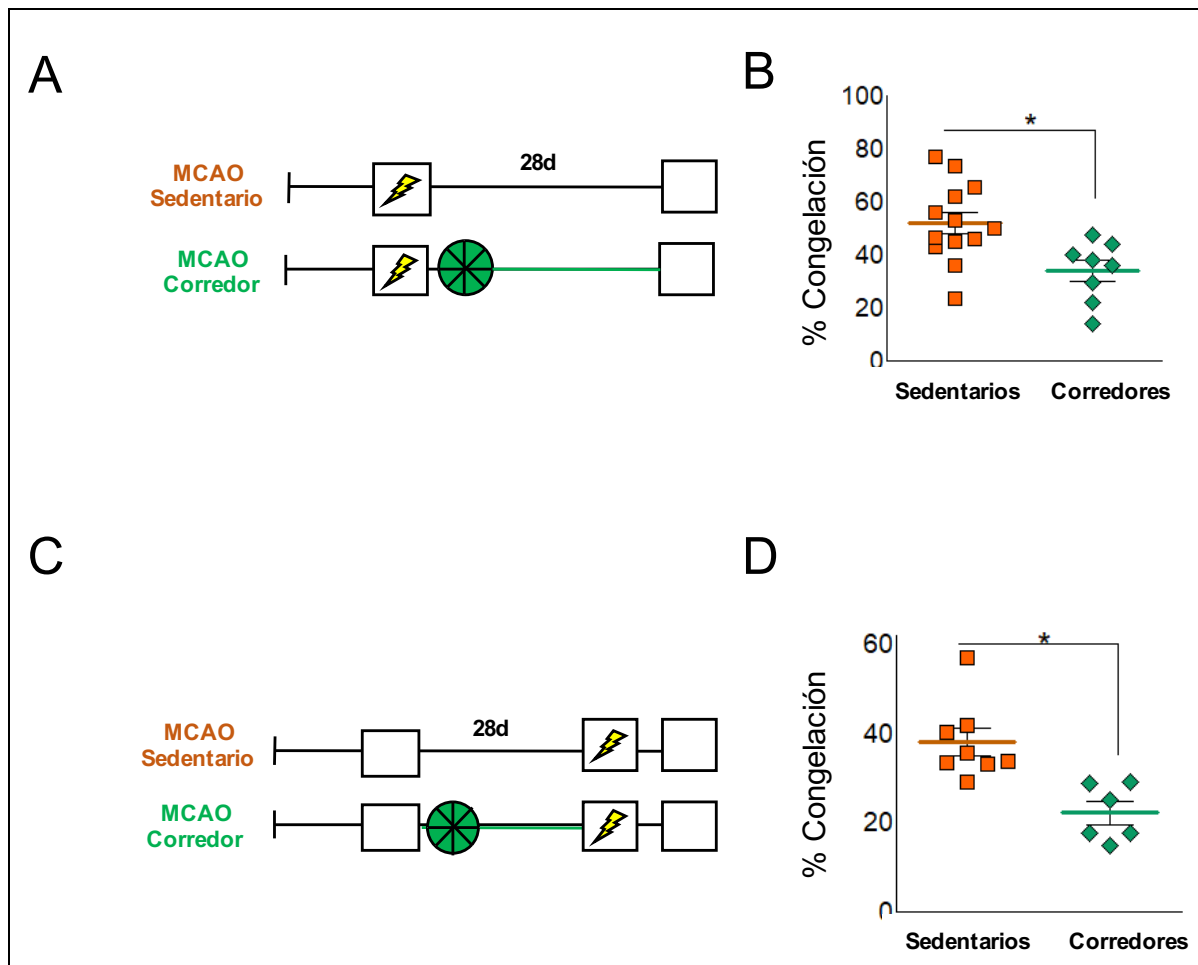


Figura 42. La potenciación de la neurogénesis hipocampal inducida por ejercicio voluntario tras ictus se asocia a un empeoramiento del deterioro cognitivo. (A) Protocolo experimental para el panel (B). 7 días tras la isquemia, se entrenaron los animales al test CMC (0,6mAx3) y se les permitió realizar ejercicio físico voluntario mediante una rueda de correr; su capacidad de recuerdo se analizó 28 días después. (B) Respuesta de congelación de los animales sometidos a isquemia sedentarios y corredores 28 días tras CMC (* $p < 0.05$ vs. MCAO sedentarios; MCAO sedentarios, $n = 13$ y MCAO corredores, $n = 8$). (C) Protocolo experimental para el panel (D). 7 días tras la isquemia, se introdujeron los animales en el dispositivo del test CMC durante 10 minutos sin recibir ningún estímulo aversivo. Posteriormente se les dio acceso a realizar ejercicio físico voluntario mediante una rueda de correr. 28 días después, se reintrodujeron los animales y recibieron el

estímulo aversivo (1mAx1). La capacidad de retención se analizó 24 horas más tarde. (D) Respuesta de congelación de los animales sedentarios y corredores sometidos a isquemia 28 días tras CMC (* $p < 0.05$ vs. MCAO sedentarios; MCAO sedentarios, $n=8$ and MCAO corredores, $n=6$). Estadística: (B y D) un test de dos colas Mann-Whitney.

Para confirmar estos resultados, a continuación se llevó a cabo el análisis de la memoria de tipo espacial mediante el empleo del laberinto de Barnes (Figura 43, A-B). De acuerdo con los resultados anteriores, los déficits en memoria espacial observados en el grupo de animales isquémicos *sedentarios* se vieron potenciados en los animales isquémicos *corredores*. De hecho, este último grupo no fue capaz de identificar ni el agujero correcto ni su correspondiente cuadrante (Figura 43, C-D), mostrando por lo tanto un comportamiento aleatorio sin ninguna preferencia en el laberinto.

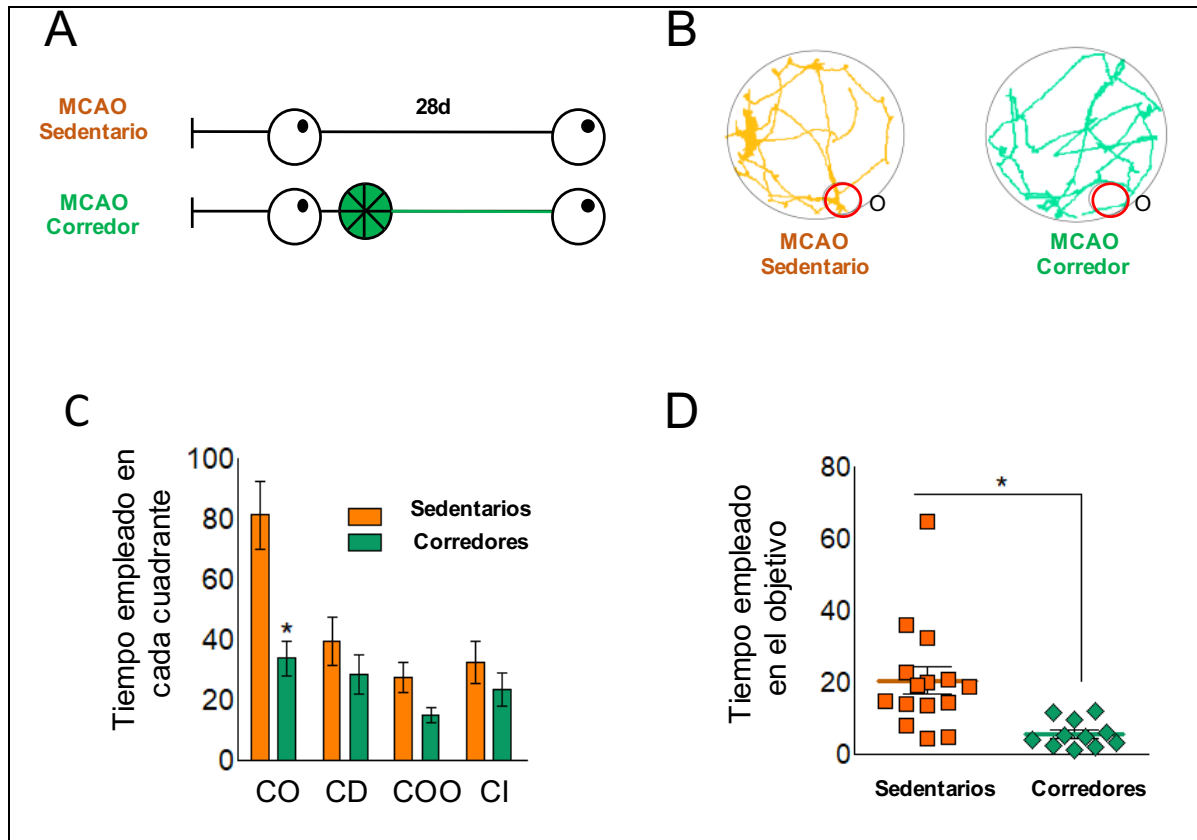


Figura 43. La potenciación de la neurogénesis hipocampal por ejercicio voluntario tras ictus está asociada a un empeoramiento de la memoria espacial. (A) Protocolo experimental para los paneles (B-D). (B) Trazados del comportamiento de búsqueda llevado a cabo por los animales isquémicos sedentarios (izquierda) y corredores (derecha) el día del test. (C) Tiempo empleado por los animales isquémicos sedentarios y corredores en cada cuadrante. Se identificó una interacción significativa entre los diferentes cuadrantes y correr ($(F_{(3,96)} = 3.06; p = 0.0317)$; MCAO sedentarios, $n = 15$; MCAO corredores, $n = 11$; $*p < 0.05$ vs. MCAO sedentarios CO; Bonferroni post-test). (D) Tiempo empleado por los animales isquémicos sedentarios y corredores alrededor del agujero objetivo durante el día del test ($*p < 0.05$ vs. MCAO sedentarios; MCAO sedentarios, $n = 15$; MCAO corredores, $n = 11$). CO Cuadrante objetivo, CD Cuadrante derecho, CI Cuadrante izquierdo y CCO Cuadrante contrario al objetivo. Estadística: (C) ANOVA de dos vías no paramétrico seguido de un post-test de Bonferroni; (D) test de dos colas Mann-Whitney.

5.1.3.2 Efecto del aumento de neurogénesis inducido por estimulación farmacológica sobre el deterioro cognitivo tras la isquemia cerebral

A continuación se analizó si la potenciación farmacológica de la neurogénesis hipocampal tras ictus producía un empeoramiento del deterioro cognitivo. Esta estrategia se llevó a cabo mediante un tratamiento con el antagonista no competitivo de los receptores NMDA, memantina (MEM) (Ishikawa et al., 2016). En

primer lugar, se confirmó que el tratamiento con memantina producía un incremento en los niveles de neuroblastos DCX⁺ en los animales sham (Figura 44, A-B), y que ello se correlacionaba con menores niveles de respuesta de congelación cuatro semanas tras haber sido sometidos los animales al test CMC (Figura 44, C-D).

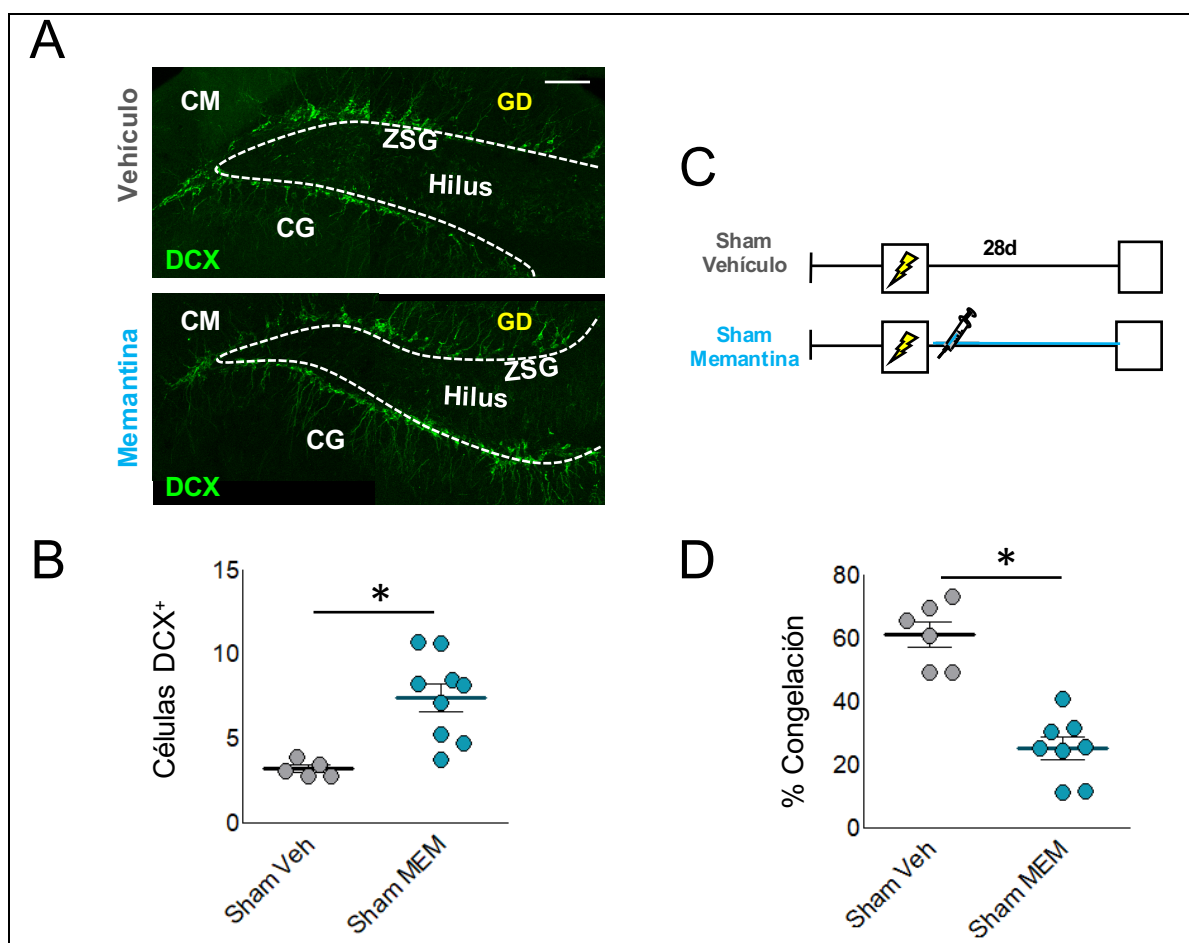


Figura 44. Potenciación del olvido mediante estimulación farmacológica de la neurogénesis hipocampal. (A) Imágenes representativas de las células DCX⁺ en los animales sham tratados con vehículo o memantina (MEM). (B) Cuantificación del número de células DCX⁺ en los animales tratados con vehículo o MEM (*p<0.05 vs. sham vehículo). (C) Diseño experimental para el panel (D). (D) Respuesta de congelación de los animales sham tratados con vehículo o MEM 28 días después de someterlos al test CMC (0,6mAx3) (*p<0.05 vs. sham vehículo). Giro dentado: GD, zona subgranular: ZSG, capa granular: CG, capa molecular: CM. Escala = 100µm. Estadística: (B y D) test t de Student no pareado seguido de un test de dos colas Mann-Whitney.

El tratamiento con MEM también provocó una potenciación del número de neuroblastos, tanto en los hipocampos ipsi- como contralesionales de los animales isquémicos respecto a sus respectivos controles tratados con vehículo (**Figura 45, A-B**). De nuevo, confirmando nuestros resultados previos, los animales isquémicos tratados con MEM mostraron una reducción en su capacidad de recuerdo respecto al grupo control cuando ésta se analizó 4 semanas tras ser sometidos al test de CMC (**Figura 45, C-D**).

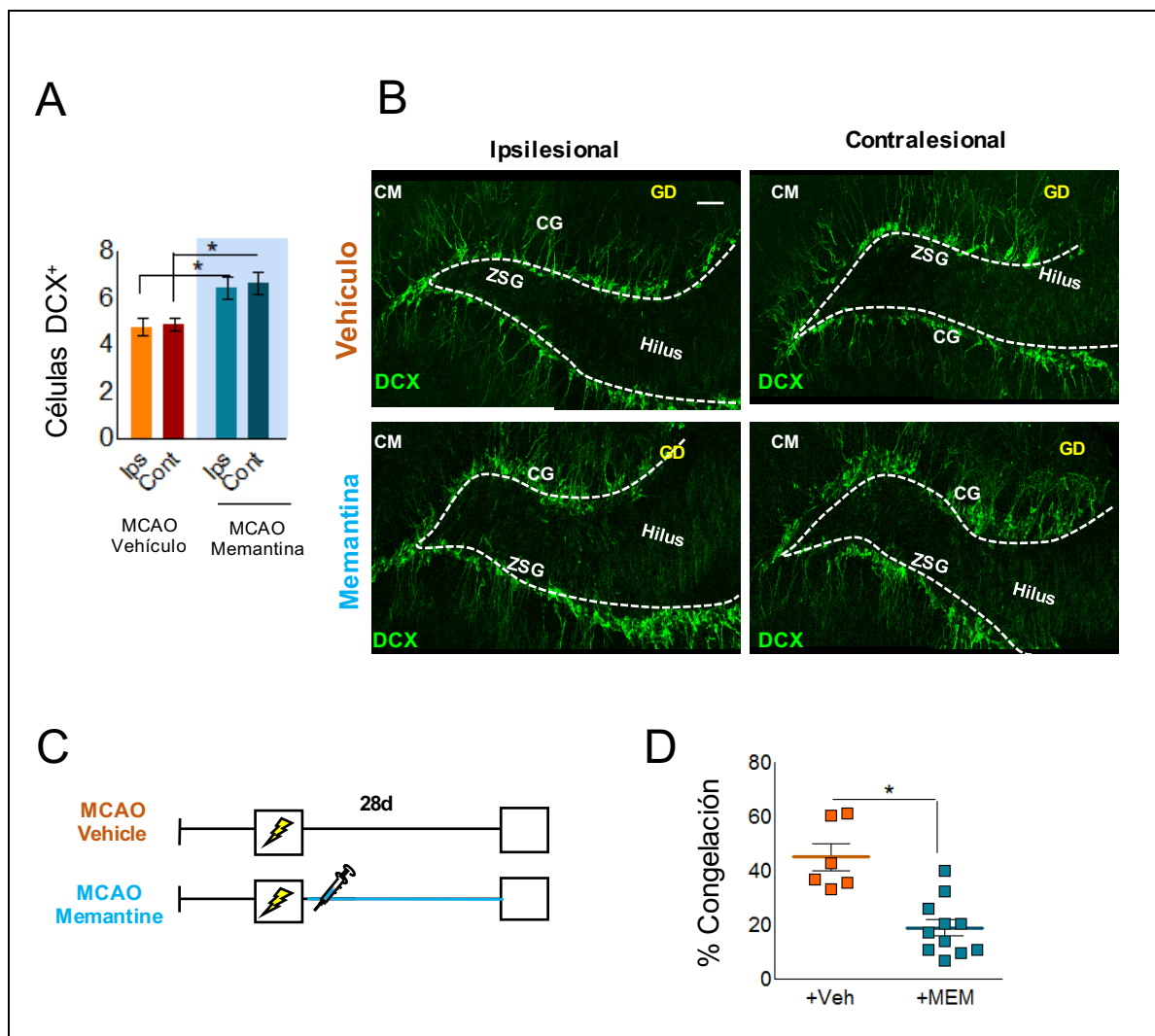


Figura 45. Agravamiento del deterioro cognitivo post-isquemia cerebral tras la potenciación farmacológica de la neurogénesis hipocampal. (A) Cuantificación del número de células DCX⁺ en el hipocampo ipsi- y contralesional de los animales isquémicos tratados con vehículo o memantina (MEM). Se observó un efecto significativo entre el tratamiento con MEM y el número de células DCX⁺ ($F_{(1,34)} = 14.62$; $p = 0.0005$) tanto en el hipocampo ipsi- como contralesional (* $p < 0.05$ vs. MCAO vehículo; MCAO vehículo, $n = 8$ y MCAO memantina, $n = 11$; Bonferroni post-test). **(B)**

Imágenes representativas de las células DCX⁺. (C) Protocolo experimental para el panel (D). (D) Respuesta de congelación de los animales isquémicos tratados con vehículo o memantina 28 días después de someterlos al test del condicionamiento al miedo contextual (0,6mA x 3) (*p<0.05 vs. MCAO vehículo; MCAO vehículo, n=6 y MCAO memantina, n=11). Giro dentado: GD, zona subgranular: ZSG, capa granular: CG y capa molecular: CM. Escala = 100µm. Estadística: (A) ANOVA de dos vías no paramétrico seguido de un post-test de Bonferroni; (D) test de dos colas Mann-Whitney.

Todos estos resultados apoyan la idea de que la potenciación de la neurogénesis hipocampal tras isquemia cerebral interfiere negativamente en la capacidad de recuerdo de memorias adquiridas previamente.

5.1.4 Remodelacion de los circuitos hipocampales tras isquemia cerebral

Para el recuerdo de memorias antiguas es necesario la reactivación del circuito neural implicado durante el aprendizaje (Girardeau et al., 2009; Dupret et al., 2010). Previamente hemos descrito que la isquemia provoca un patrón de activación neuronal diferencial (medido por la distribución del marcador c-Fos) en el momento del análisis de la capacidad de retención de memorias previamente aprendidas.

Puesto que, a través de la neurogénesis, se produce la integración de nuevas neuronas en los circuitos hipocampales, la sobreestimulación de la neurogénesis podría regular negativamente la capacidad de recuerdo de memorias previas como consecuencia de la remodelación de las sinapsis pre-existentes y de la circuitería hipocampal. Dicho mecanismo ha sido previamente descrito para explicar el *olvido* (Akers et al., 2014). De hecho, la estimulación neurogénica junto con los cambios morfológicos en las nuevas neuronas hipocampales en diferentes modelos de isquemia (Niv et al., 2012; Witke et al., 2017) podrían explicar la correlación negativa encontrada entre neurogénesis y capacidad cognitiva dependiente del hipocampo en nuestro modelo de isquemia cortical.

5.1.4.1 Remodelación diferencial de los circuitos hipocampales tras isquemia: estudio en nuevas neuronas inmaduras

Para estudiar la remodelación hipocampal que se pudiese estar produciendo en nuestro modelo de isquemia, en primer lugar se caracterizó la distribución de la arborización dendrítica de las nuevas neuronas inmaduras DCX⁺ a lo largo de la capa granular y molecular del giro dentado.

Nuestros resultados muestran un patrón diferencial de arborización entre ambos hipocampos: mientras que el hipocampo contralesional presentaba un mayor porcentaje de arborización dendrítica en la capa molecular, no se observaron diferencias en el hipocampo ipsilesional ([Figura 46, A-B](#)).

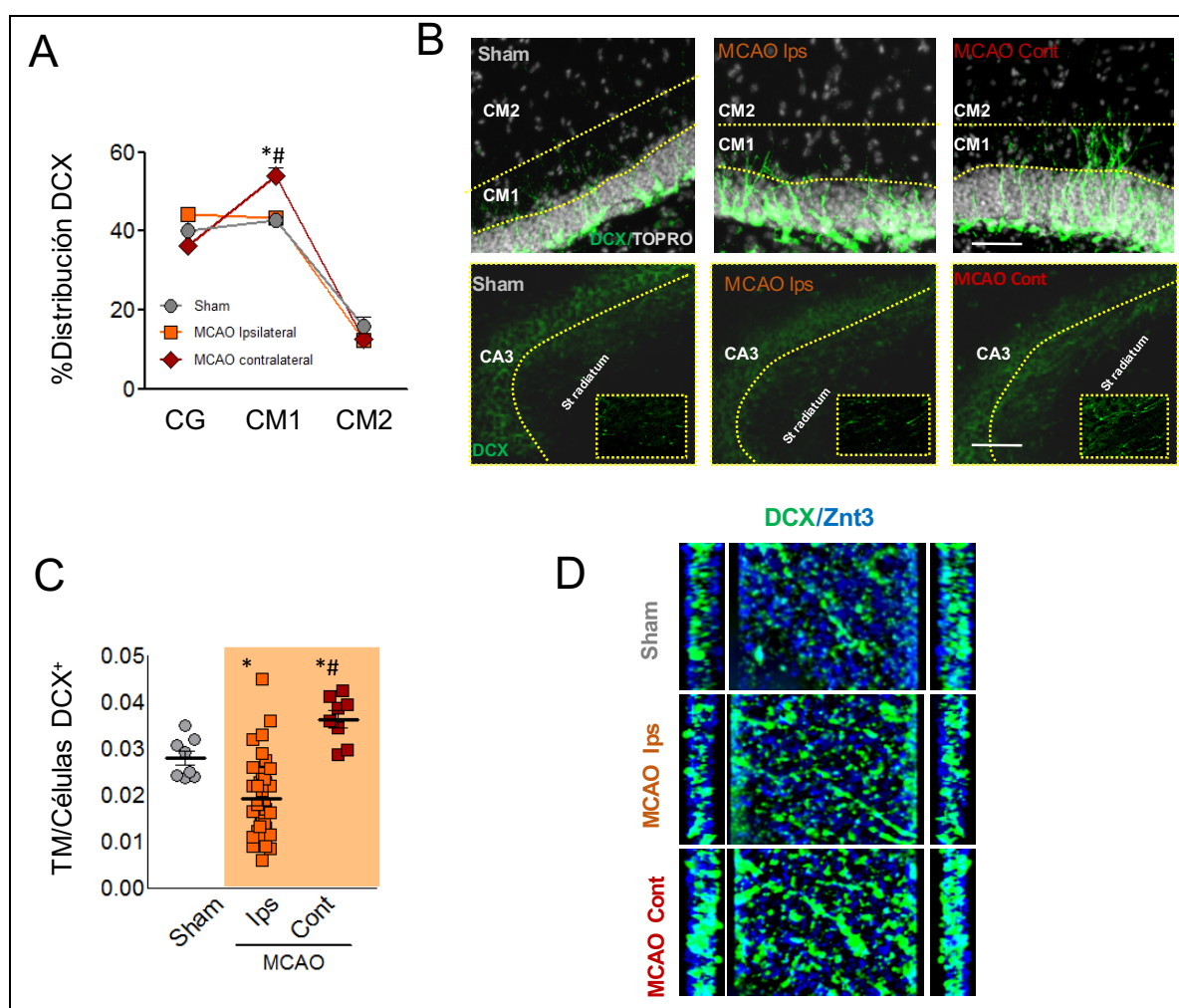


Figura 46. Remodelación de los circuitos hipocampales por las nuevas neuronas inmaduras tras isquemia cerebral. (A) Análisis de la distribución del marcador DCX en las distintas regiones del giro dentado en los animales sham e isquémicos 35 días después de la isquemia. Se identificó una interacción significativa entre la distribución del marcador DCX y los grupos experimentales ($F_{(1,16)} = 4.84$; $p = 0.0040$) (*# $p < 0.05$ vs. sham y MCAO ipsilesional, respectivamente; Sham, $n = 7$; MCAO ipsilesional, $n = 12$ y MCAO contralesional, $n = 12$; Bonferroni post-test). **(B)** Imágenes representativas de la morfología de las neuronas DCX⁺. **(C)** Cuantificación de la densidad de terminales musgosos (TM) inmaduras DCX⁺ en la región de CA3 del giro dentado en los animales sham e isquémicos 35 días después de la isquemia. Los datos se representan como el cociente entre TM en CA3 y el número de neuronas DCX⁺ en el giro dentado. (*# $p < 0.05$ vs. sham y MCAO ipsilesional, respectivamente; sham, $n = 7$; MCAO ipsilesional, $n = 12$ y MCAO contralesional, $n = 12$). **(D)** Imágenes representativas de las nuevas TM en CA3 en los diferentes grupos en combinación con el marcador presináptico ZnT3 (Transportador de Zinc 3). Capa molecular 1: CM1, capa molecular 2: CM2 y *St. radiatum*: *Stratum radiatum*. Escala = 100 μ m. Estadística: **(A)** ANOVA de dos vías no paramétrica seguido de un post-test de Bonferroni; **(C)** ANOVA de una vía no paramétrica seguida de un post-test de Kruskal Wallis.

Igualmente, se analizó si la isquemia estaba produciendo alteraciones a nivel de las conexiones axonales de los neuroblastos (*terminales de la fibra musgosa*) con las neuronas de la región de CA3. Nuestros datos mostraron que la isquemia produjo una respuesta diferencial a este nivel. Mientras que en el hipocampo contralesional se incrementó la densidad de terminales, la isquemia promovió una disminución del número de terminales axonales en el hipocampo ipsilesional (**Figura 46, C-D**). Estos resultados indican una remodelación diferencial en los circuitos hipocámpales ipsi- y contralesionales por la isquemia cerebral.

5.1.4.2 Remodelación diferencial de los circuitos hipocámpales: estudio en nuevas neuronas maduras

En la neurogénesis hipocámpal, los neuroblastos comienzan a adquirir las propiedades de neuronas maduras a partir de la segunda-tercera semana, coincidiendo con el establecimiento de las primeras sinapsis tanto en la zona dendrítica como axonal por medio de las espinas dendríticas y terminales sinápticos, respectivamente. Teniendo en cuenta los cambios morfológicos observados en neuronas inmaduras, se decidió confirmar estos resultados en las nuevas neuronas maduras. Para ello, se inyectó un retrovirus portador del gen codificante para la proteína fluorescente verde (*green fluorescent protein: GFP*) en la región hilar del giro dentado de ambos hemisferios en animales isquémicos y sham. Tanto el análisis sholl (**Figura 47, A-B**) como la longitud dendrítica (**Figura 47, C**) mostraron un fenotipo comparable al observado previamente en los neuroblastos en cuanto a la complejidad dendrítica de las neuronas GFP⁺ del GD contralesional: estas neuronas presentaban un incremento tanto de la complejidad dendrítica en la región distal de la capa molecular (CM) (150-250 μ m desde el soma) (**Figura 47, B**) como de la longitud dendrítica total respecto a las neuronas

GFP⁺ del GD ipsilesional y sham (Figura 47, C). Sin embargo, de nuevo observamos un remodelado diferencial tras isquemia ya que, mientras que el patrón de arborización dendrítica en la región proximal (0-50 μ m desde el soma) era más complejo en las neuronas GFP⁺ del GD ipsilesional, éstas presentaron una reducción del mismo en la región distal de la CM (Figura 47, A-B). Estas neuronas igualmente mostraron una reducción en cuanto a la longitud dendrítica total (Figura 47, C).

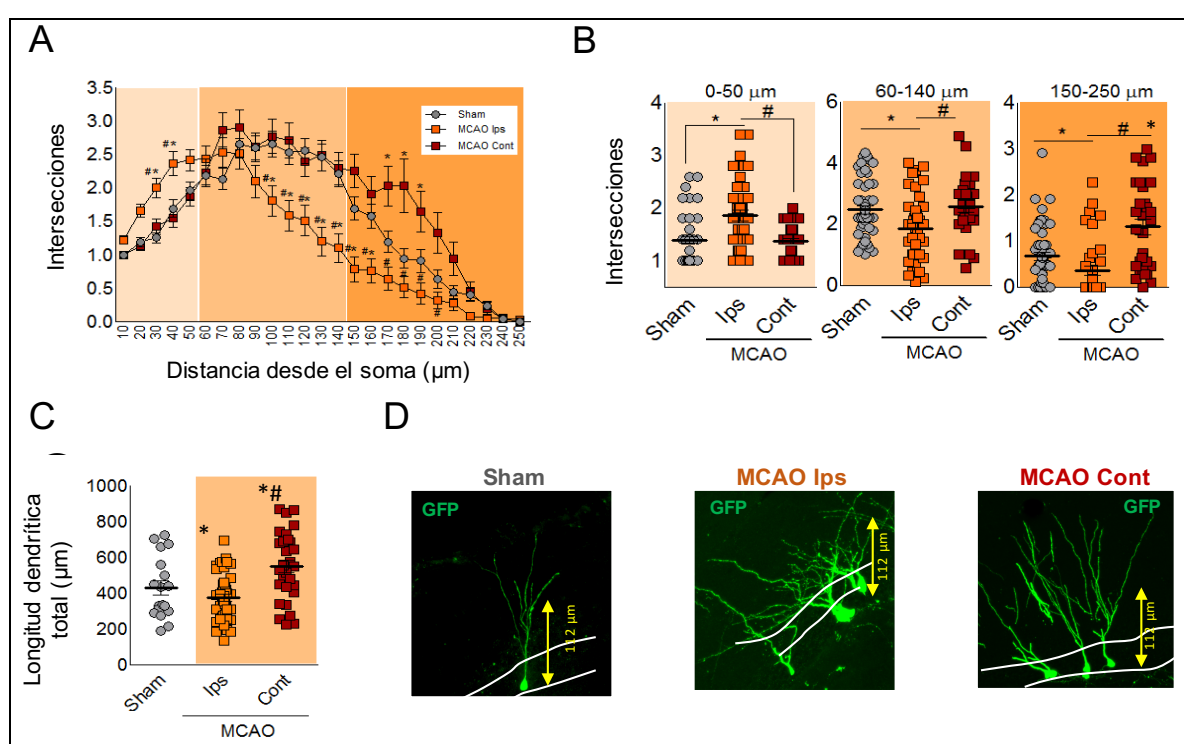


Figura 47. Remodelación de los circuitos hipocámpales por las nuevas neuronas maduras tras isquemia cerebral. (A-B) Análisis sholl de las nuevas neuronas GFP⁺ del giro dentado de los animales sham e isquémicos 28 días después de la infección. La inyección del retrovirus se realizó a los 14 días tras la cirugía coincidiendo con el pico proliferativo. **(A)** Se identificó una interacción significativa entre la distancia desde el soma y los grupos experimentales en el número de intersecciones ($F_{(48,302)} = 5.18$; $p < 0.0001$) (*# $p < 0.05$ vs. sham y MCAO ipsilesional, respectivamente; Sham, $n = 32$ neuronas/4 animales; MCAO ipsilesional, $n = 52$ neuronas/4 animales y MCAO contralesional, $n = 40$ neuronas/3 animales; Bonferroni post-test). **(B)** Cuantificación del número de intersecciones de las neuronas GFP⁺ en los animales sham e isquémicos (en los hipocámpos ipsi- y contralesional) en los diferentes intervalos estudiados desde el soma neuronal. De izquierda a derecha (0-50 μ m; 60-140 μ m y 150-250 μ m, respectivamente) (*# $p < 0.05$ vs. sham y MCAO ipsilesional, respectivamente; sham, $n = 32$ neuronas/4 animales; MCAO ipsilesional, $n = 52$ neuronas/4 animales y MCAO contralesional, $n = 40$ neuronas/3 animales). **(C)** Longitud dendrítica total de las neuronas GFP⁺ en los animales sham e isquémicos (en los hipocámpos ipsi- y contralesional) (*# $p < 0.05$ vs. sham y MCAO ipsilesional, respectivamente; Sham, $n = 18$ neuronas/4

animales; MCAO ipsilesional, n=45 neuronas/4 animales y MCAO contralesional, n=21 neuronas/3 animales). (D) Imágenes representativas de las neuronas GFP⁺ en los diferentes grupos experimentales. Estadística: (A y B) ANOVA de dos vías no paramétrico seguido de un post-test de Bonferroni; (C) ANOVA de una vía no paramétrica seguido de un post-test de Kruskal Wallis.

Las nuevas neuronas granulares se caracterizan por presentar una única dendrita apical que se ramifica para dar lugar a las diferentes proyecciones dendríticas, estableciendo las correspondientes sinapsis con las aferencias procedentes del tracto perforante de la corteza entorrinal. Por tanto, el crecimiento y desarrollo correcto de la dendrita apical resulta un factor clave en la integración de las nuevas neuronas en los circuitos hipocampales (Shapiro et al., 2007; Llorens-Martín et al., 2015). Un hallazgo interesante de nuestro estudio es que, mientras que las neuronas GFP⁺ del GD contralesional presentan un alargamiento de la dendrita apical en comparación tanto con las del ipsilesional como con las del grupo sham, las neuronas GFP⁺ del ipsilesional sufrieron una retracción de la dendrita apical respecto a los otros grupos (Figura 48, A).

Tras llevar a cabo una clasificación de las neuronas GFP⁺ por intervalos de longitud dendrítica apical, se observó que la alteración de este parámetro por parte de la isquemia cerebral afectaba diferencialmente al 30% de la población de las nuevas neuronas en el GD ipsilesional y contralesional (presentando un fenotipo aberrante de longitud dendrítica apical mayoritario de <10um y 40-70um, respectivamente), en comparación con las neuronas GFP⁺ del grupo sham (fenotipo predominante de longitud dendrítica mayoritario 10-40um) (Figura 48, B).

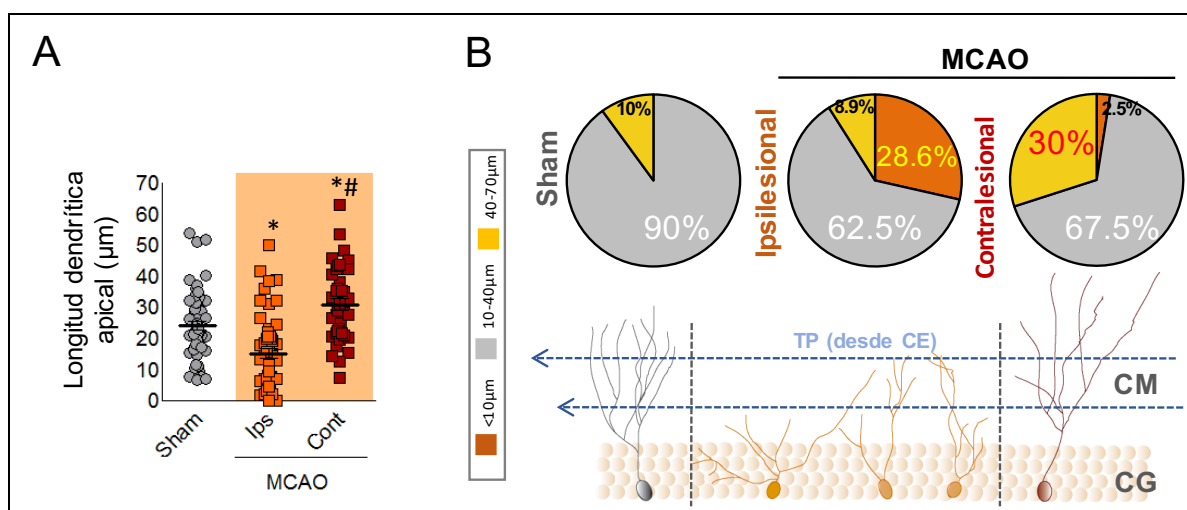


Figura 48. Alteraciones en la longitud dendrítica apical de las nuevas neuronas GFP⁺ tras ictus. (A) Cuantificación de la longitud de la dendrita apical de las nuevas neuronas GFP⁺ en los animales sham e isquémicos (en los hipocampos ipsi- y contralateral) 28 días después de la infección (*#p<0.05 vs. sham y MCAO ipsilesional, respectivamente; Sham, n=61 neuronas/4 animales; MCAO ipsilesional, n=60 neuronas/4 animales y MCAO contralateral, n=50 neuronas/3 animales; Bonferroni post-test). (B) Clasificación y representación de los diferentes tipos neuronales observados en los distintos grupos experimentales atendiendo al patrón de la longitud de la dendrita apical <10μm, 10-40μm y >40μm (Sham, n=61 neuronas/4 animales; MCAO ipsilesional, n=60 neuronas/4 animales y MCAO contralateral, n=50 neuronas/3 animales). TP tracto perforante y CE: corteza entorrinal. Estadística: (A) ANOVA de una vía no paramétrica seguido de un post-test de Kruskal Wallis.

Junto con los cambios en el patrón de arborización dendrítica, el número de espinas dendríticas se considera uno de los elementos clásicos en los procesos de plasticidad en el desarrollo y maduración de las nuevas neuronas generadas durante la neurogénesis hipocampal adulta. Por tanto, para analizar si la isquemia cerebral estaba ejerciendo un efecto sobre la capacidad de integración de la información procedente de la corteza entorrinal sobre las nuevas neuronas generadas en el GD, se llevó a cabo un estudio de la densidad de espinas dendríticas. La isquemia cerebral no produjo ningún efecto en la densidad de espinas dendríticas en las nuevas neuronas generadas de los hipocampos ipsi- y contralateral en comparación con las del grupo sham (Figura 49, A), sugiriendo

que el grado de integración neuronal junto con la capacidad de respuesta de estas neuronas no se encuentra alterado.

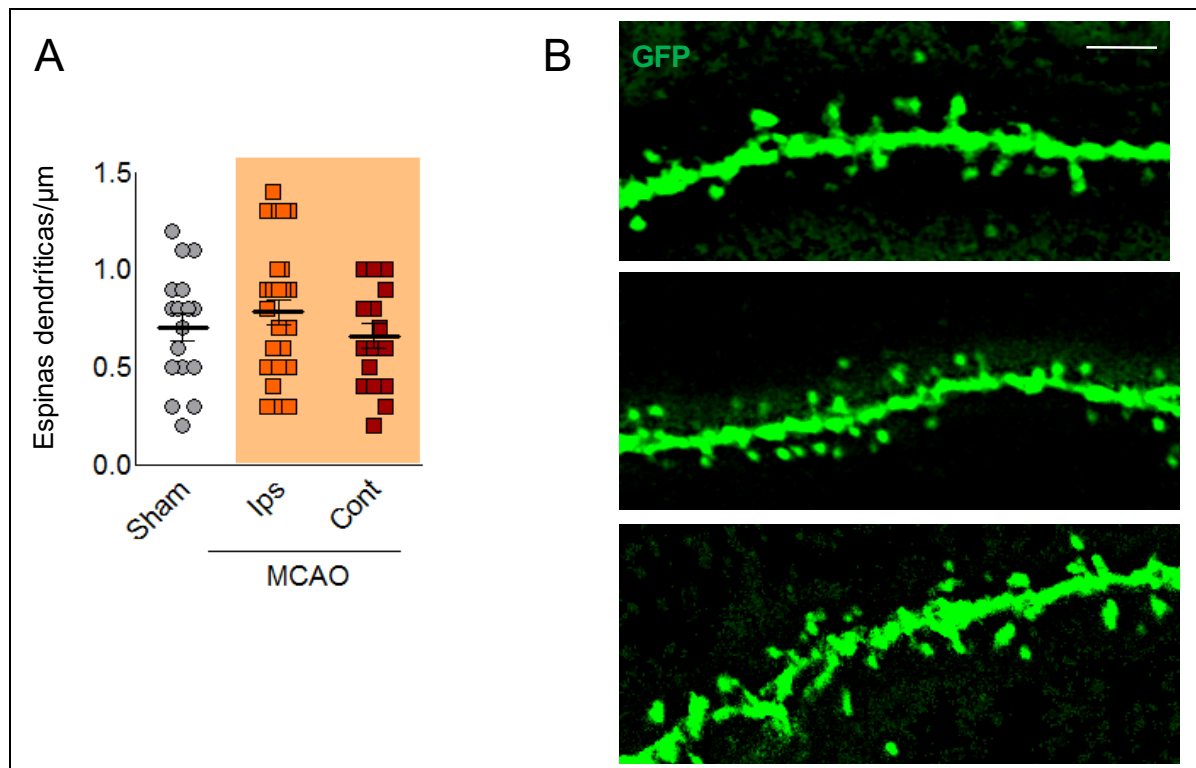


Figura 49. Densidad de espinas dendríticas en las nuevas neuronas granulares tras isquemia cerebral. (A) Cuantificación del número de espinas dendríticas de las nuevas neuronas GFP⁺ en los grupos de animales sham e isquémicos (en los hipocampos ipsi- y contralesional) 28 días después de la infección. (B) Imágenes representativas de la densidad de espinas dendríticas en el segmento externo de la capa molecular en cada grupo experimental. Escala = 10μm. Estadística: ANOVA de una vía no paramétrico seguido de un post-test de Kruskal Wallis.

Estos resultados sugieren que la isquemia produce cambios morfológicos diferenciales y aberrantes en las nuevas neuronas generadas en el hipocampo ipsi- y contralesional. Por tanto, la integración de las mismas en los circuitos hipocámpales preexistentes podría explicar el deterioro cognitivo previamente descrito.

5.1.5 Efecto de la inhibición de la neurogénesis hipocampal y su papel en el deterioro cognitivo tras isquemia cerebral

Los resultados expuestos hasta ahora muestran que la isquemia cerebral produce una respuesta neurogénica aberrante y un remodelado diferencial de los circuitos hipocampales, concomitante al olvido de memorias previas. Por tanto, se planteó la reducción de esta respuesta neurogénica tras isquemia a niveles fisiológicos como posible estrategia para mejorar el deterioro cognitivo producido por el ictus.

5.1.5.1 Recuperación del deterioro cognitivo asociado a la isquemia cerebral tras restauración farmacológica de los niveles neurogénicos hipocampales

En primer lugar, se llevó a cabo una aproximación farmacológica para reducir la respuesta neurogénica tras isquemia basada en el tratamiento con temozolomida (TMZ). La TMZ es un agente alquilante del ADN que inhibe su replicación y, por tanto, provoca la muerte de las células con capacidad mitótica, como es el caso de las células madre neurales del hipocampo.

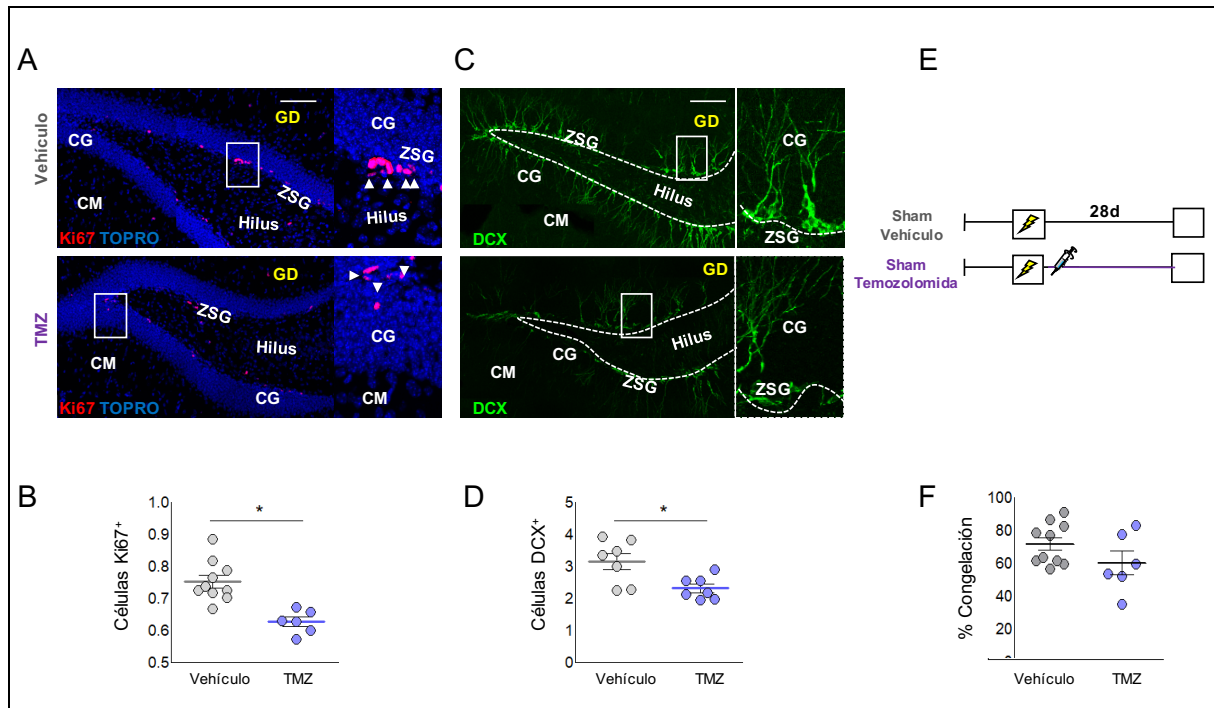


Figura 50. Neurogénesis hipocampal y capacidad de retención tras el tratamiento con temozolomida. (A-B) Imágenes representativas (A) y cuantificación de las células Ki67⁺ (B) en los animales tratados con vehículo o con temozolomida (TMZ) (*p<0.05 vs vehículo). (C-D) Imágenes representativas (C) y cuantificación de las células DCX⁺ (D) en los animales tratados con vehículo o con temozolomida (TMZ) (*p<0.05 vs vehículo). (E) Protocolo experimental para panel (F). (F) Porcentaje de congelación de los animales sham tratados con vehículo o TMZ (p>0.05 vs vehículo) tras someterles al test CMC (0,6mAx3). Giro dentado: GD, zona subgranular: ZSG, capa granular: CG, capa molecular: CM. Escala = 100µm; magnificación = 20µm. Estadística: (B, D y F) test de dos colas Mann-Whitney.

El tratamiento con TMZ provocó una reducción en los niveles de proliferación (Figura 50, B y Figura 51, B) y de neuroblastos (Figura 50, D y Figura 51, D), tanto en el grupo control como en los animales isquémicos (en ambos GD ipsi- y GD contralesional) respecto a los grupos tratados con vehículo.

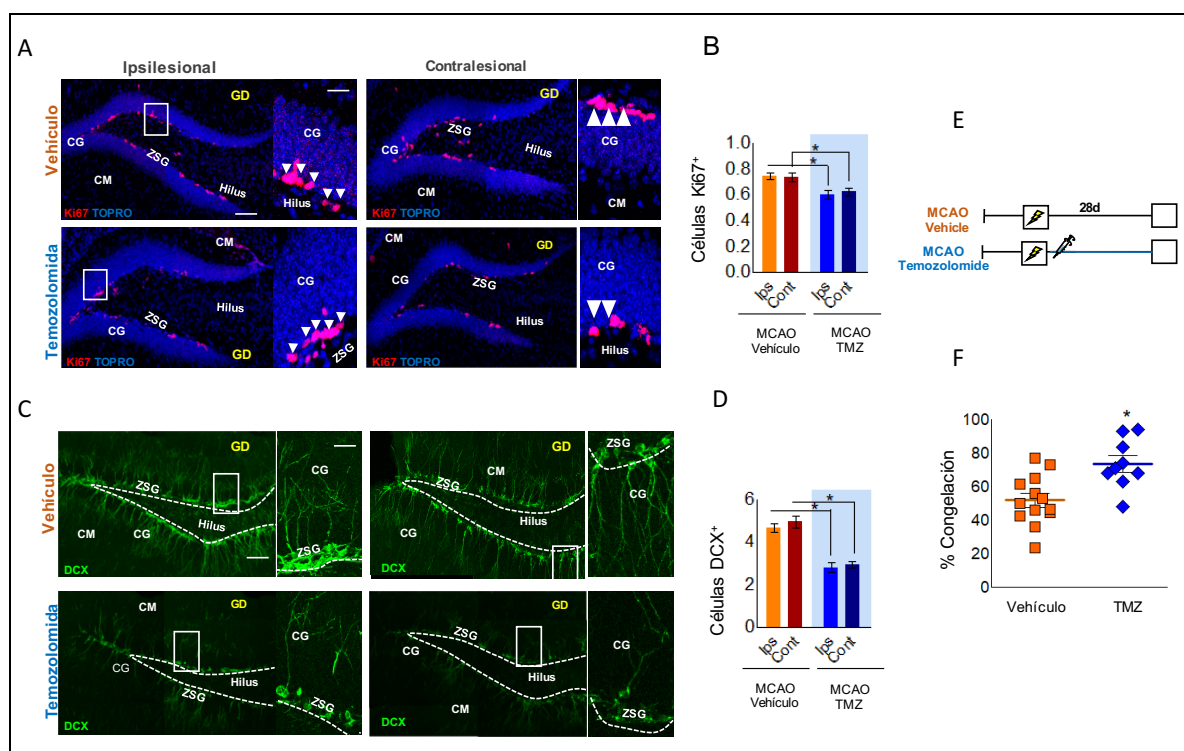


Figura 51. Inhibición del estímulo neurogénico tras ictus y recuperación del deterioro cognitivo mediante el tratamiento con temozolomida. (A y C) Imágenes representativas de las células Ki67⁺ (A) y DCX⁺ (C) en los animales isquémicos tratados con vehículo (arriba) o TMZ (abajo). **(B y D)** Número de células proliferativas Ki67⁺ (B) y DCX⁺ (D) en los hemisferios ipsi- y contralateral de los animales isquémicos tratados con vehículo o temozolomida (TMZ). Se identificó una interacción significativa entre el efecto de la TMZ y el número de células proliferativas Ki67⁺ ($F_{(1,41)} = 17.93$; $p < 0.0001$) y DCX⁺ ($F_{(1,41)} = 78.15$; $p < 0.0001$) en ambos hipocámpos (* $p < 0.05$ vs. MCAO vehículo; MCAO vehículo, $n = 13$ y MCAO TMZ, $n = 10$; Bonferroni post-test). **(E)** Protocolo experimental para el panel (F). **(F)** Porcentaje congelación de los animales isquémicos tratados con vehículo y TMZ (* $p < 0.05$ vs vehículo) tras someterles al test CMC (0,6mAx3). Giro dentado: GD, zona subgranular: ZSG, capa granular: CG, capa molecular: CM. Escala = 100µm; magnificaciones = 20µm. Estadística: (B y D) ANOVA de dos vías no paramétrico seguido de un post-test de Bonferroni; (F) test t de Student no pareado seguido de un test de dos colas Mann-Whitney.

Acorde con nuestra hipótesis, la inhibición de la respuesta neurogénica mediante el tratamiento con TMZ mejoró la capacidad cognitiva tanto de los animales sham como de los animales isquémicos tras observarse un incremento en la respuesta de congelación en el test del CMC (Figura 50, E-F y Figura 51, E-F).

5.1.5.2 Recuperación del deterioro cognitivo asociado a la isquemia cerebral tras restauración por estrategia génica de los niveles neurogénicos hipocampales

A continuación, y para reforzar nuestra hipótesis, se llevó a cabo la inhibición de la respuesta neurogénica hipocampal tras ictus en este caso mediante una estrategia génica que se basa en la utilización de la línea de ratones Nestina-Cre^{ERT2}/NSE-ATD. En estos ratones, tras ser tratados con tamoxifeno, se produce la delección en el ADN de una secuencia de STOP situada 5' *upstream* del gen del fragmento A de la toxina de la difteria (ATD) exclusivamente en las células madre neurales nestina⁺. Esto va a provocar la muerte celular por apoptosis de las neuronas durante el proceso de diferenciación como consecuencia de la expresión de la ATD bajo el promotor del gen de la enolasa 2 (enolasa2 neurona-específico) (Figura 52).

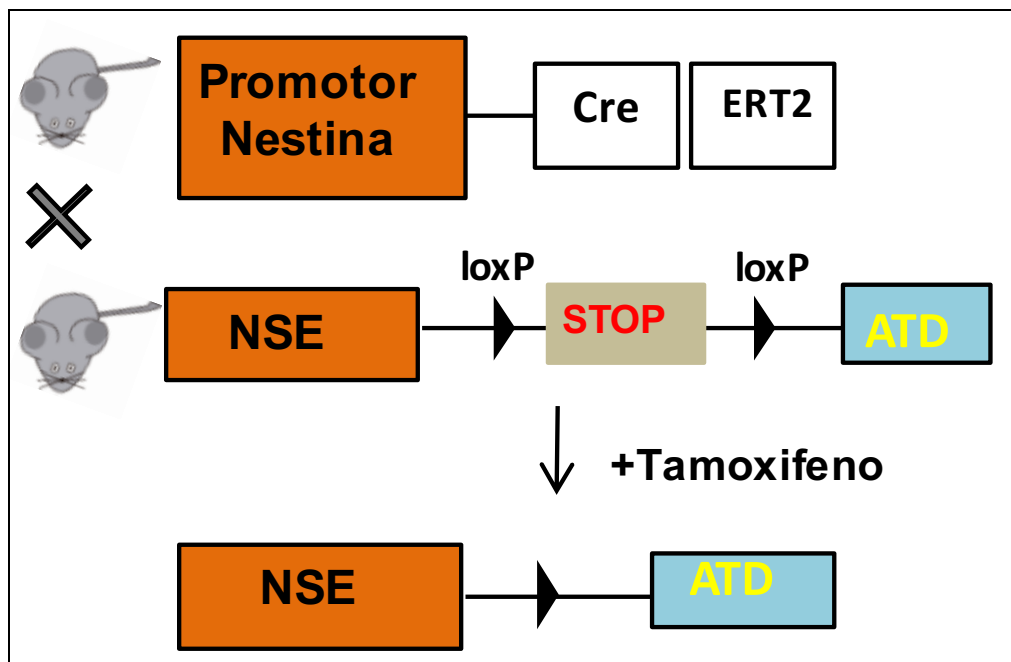


Figura 52. Generación de ratones NestinaCre^{ERT2}-NSE/ATD. El cruce de ratones que expresan la proteína CRE fusionada al receptor de estrógenos 2 (RTE2) bajo el promotor del gen nestina con los ratones que tienen, bajo el promotor del gen eno2, un codón STOP flanqueado por secuencias loxP y situado 5' *upstream* de la secuencia codificante del fragmento A de la toxina de la difteria (ATD), consigue generar ratones dobles transgénicos NestinaCre^{ERT2}-NSE/ATD. En estos animales la presencia de tamoxifeno permitirá la activación de la CRE recombinasa en las células nestina⁺

(traslocación nuclear) lo que facilitará la recombinación de los sitios loxP que flanquean el codón de STOP. Esto permitirá la expresión de la ATD bajo el promotor de la enolasa2.

En primer lugar, se observó la eficacia de la inducción de la expresión de la ATD en la reducción de la neurogénesis hipocampal tras el tratamiento con tamoxifeno en animales sham (**Figura 53, A-B**).

En el contexto de la isquemia, la inducción de la expresión de la ATD permitió llevar a cabo una ablación de las nuevas neuronas inducidas tras isquemia, dando lugar a una reducción en los niveles de neuroblastos DCX⁺ inducidos en este contexto patológico (**Figura 54, A-B**).

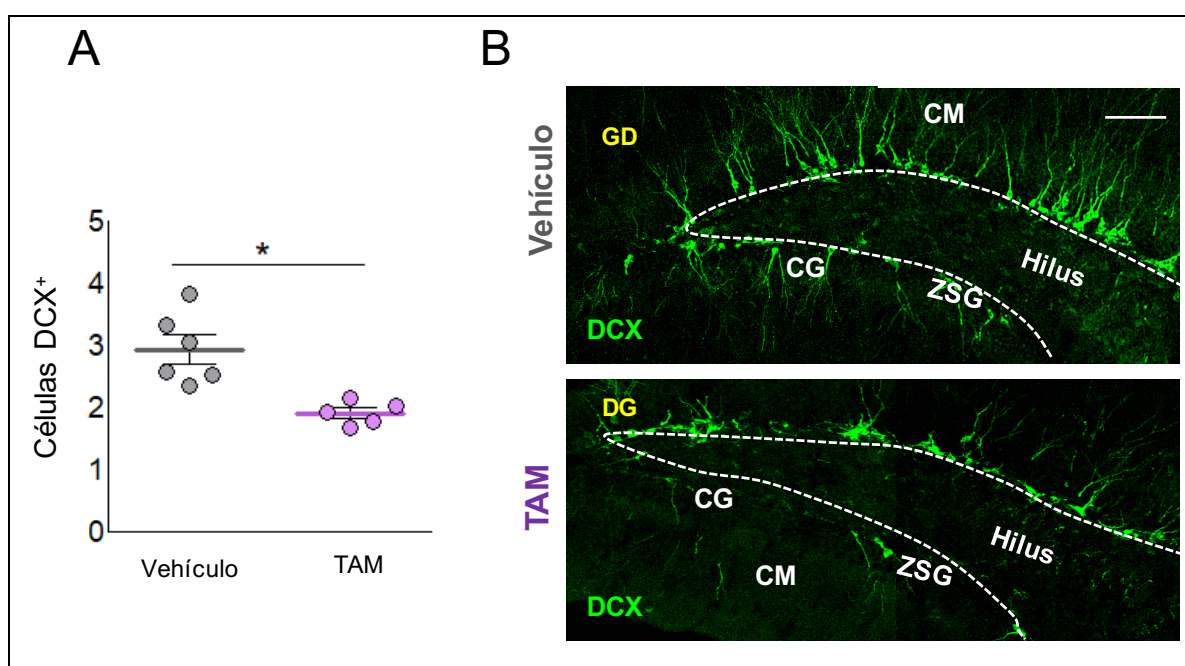


Figura 53. Inhibición de la neurogénesis hipocampal mediante estrategia génica. (A) Cuantificación de células DCX⁺ en los animales NestinaCre^{ERT2}-NSE/ATD tratados con vehículo o con tamoxifeno (TAM) (*p<0.05 vs. vehículo). **(B)** Imágenes representativas de las células DCX⁺ en los animales tratados con vehículo (arriba) o TAM (abajo). Giro dentado: GD, zona subgranular: ZSG, capa granular: CG, capa molecular: CM. Escala = 100µm. Estadística: **(A)** test t de Student no pareado seguido de un test de dos colas Mann-Whitney.

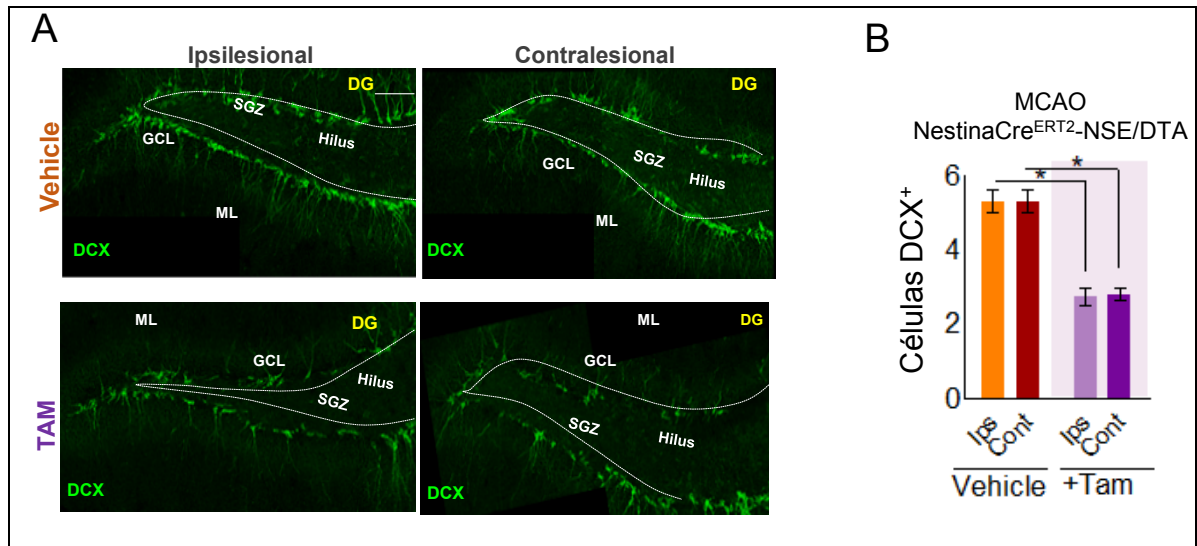


Figura 54. Inhibición del estímulo neurogénico tras isquemia mediante estrategia génica. (A) Imágenes representativas de las células DCX⁺ en los animales isquémicos NestinaCre^{ERT2}-NSE/ATD tratados con vehículo (arriba) o tamoxifeno (abajo) en los hemisferios ipsi- (izquierda) y contralesional (contralesional) 35 días después de la cirugía. **(B)** Cuantificación del número de células DCX⁺ en los animales isquémicos NestinaCre^{ERT2}-NSE/ATD tratados con vehículo o tamoxifeno (TAM) (en los hemisferios ipsi- y contralesional). Se identificó un efecto significativo del tamoxifeno en el número de células DCX⁺ ($F_{(1,38)} = 79.70$; $p < 0.0001$) en los hipocámpos ipsi- y contralesional (* $p < 0.05$ vs. NestinaCre^{ERT2}-NSE/ATD Vehículo; Vehículo, $n = 12$ y Tamoxifeno, $n = 9$; Bonferroni post-test). Giro dentado: GD, zona subgranular: ZSG, capa granular: CG, capa molecular: CM. Escala = 100µm. Estadística: **(B)** ANOVA de dos vías no paramétrico seguido de un post-test de Bonferroni.

Por otro lado, la inhibición de la neurogénesis hipocámpal aberrante en los animales isquémicos tratados con TAM respecto a sus correspondientes controles **(Figura 55, A y C)** supuso una mejoría en la capacidad de retención 28 días después de someterles al test del CMC **(Figura 55, B y D)**.

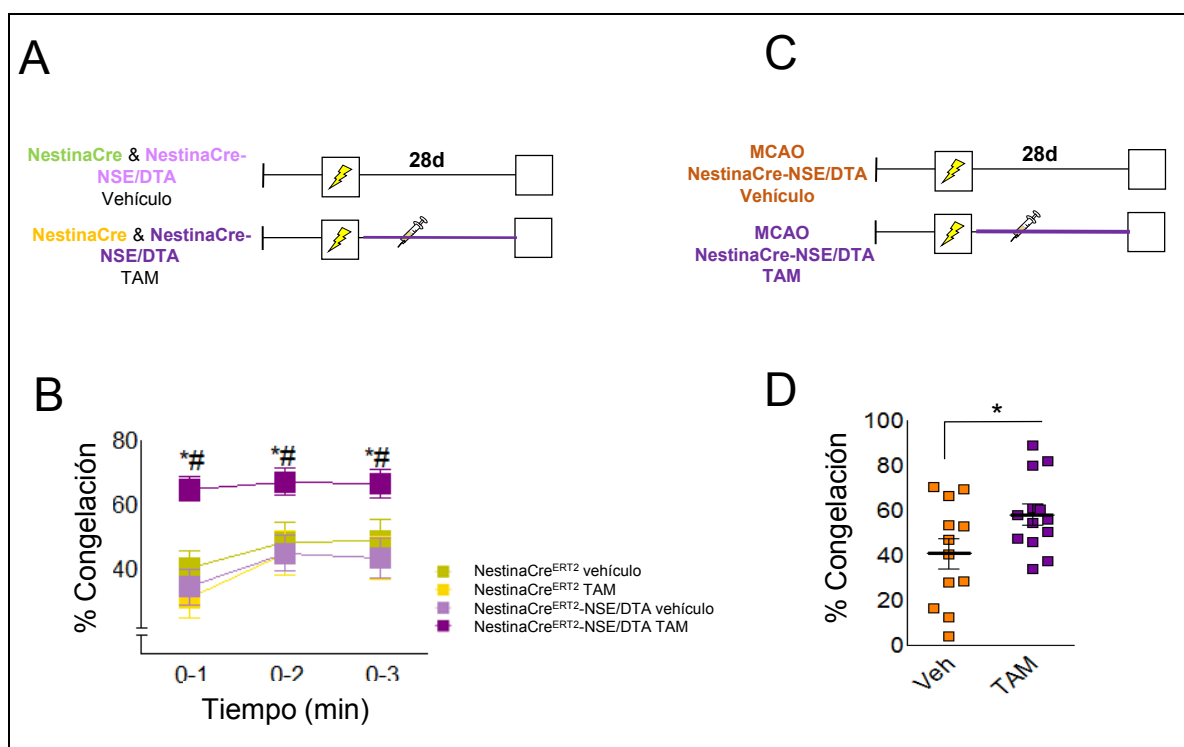


Figura 55. Recuperación de la memoria contextual en situación control y tras isquemia cerebral tras ablación génica de la neurogénesis. (A) Protocolo experimental para el panel (B). (B) Porcentaje respuesta de congelación en los animales controles (NestinaCre^{ERT2} y NestinaCre^{ERT2}-NSE/ATD) tratados con vehículo o TAM 35 días después del condicionamiento al miedo contextual (0,6mAx3). (C) Protocolo experimental para el panel (D). (D) Porcentaje respuesta de congelación de los animales isquémicos NestinaCre^{ERT2}-NSE/ATD tratados con vehículo o tamoxifeno (TAM) (*p<0.05 vs. vehículo) 35 días después del condicionamiento al miedo contextual (0,6mAx3). Estadística: (B) ANOVA de dos vías no paramétrico seguido de un post-test de Bonferroni; (D) test t de Student no pareado seguido de un test de dos colas Mann-Whitney.

Finalmente, nos propusimos comprobar si la restauración de los niveles neurogénicos hipocampales tras ictus provocaba igualmente una mejoría en cuanto a la memoria de tipo espacial empleando el test del laberinto de Barnes (Figura 56, A). La inhibición del estímulo neurogénico producido por la isquemia en los animales tratados con TAM supuso en efecto una mejoría en la memoria espacial hipocampo-dependiente cuando se analizó tanto el tiempo empleado en cada cuadrante (Figura 56, C) como en el cuadrante objetivo (Figura 56, D).

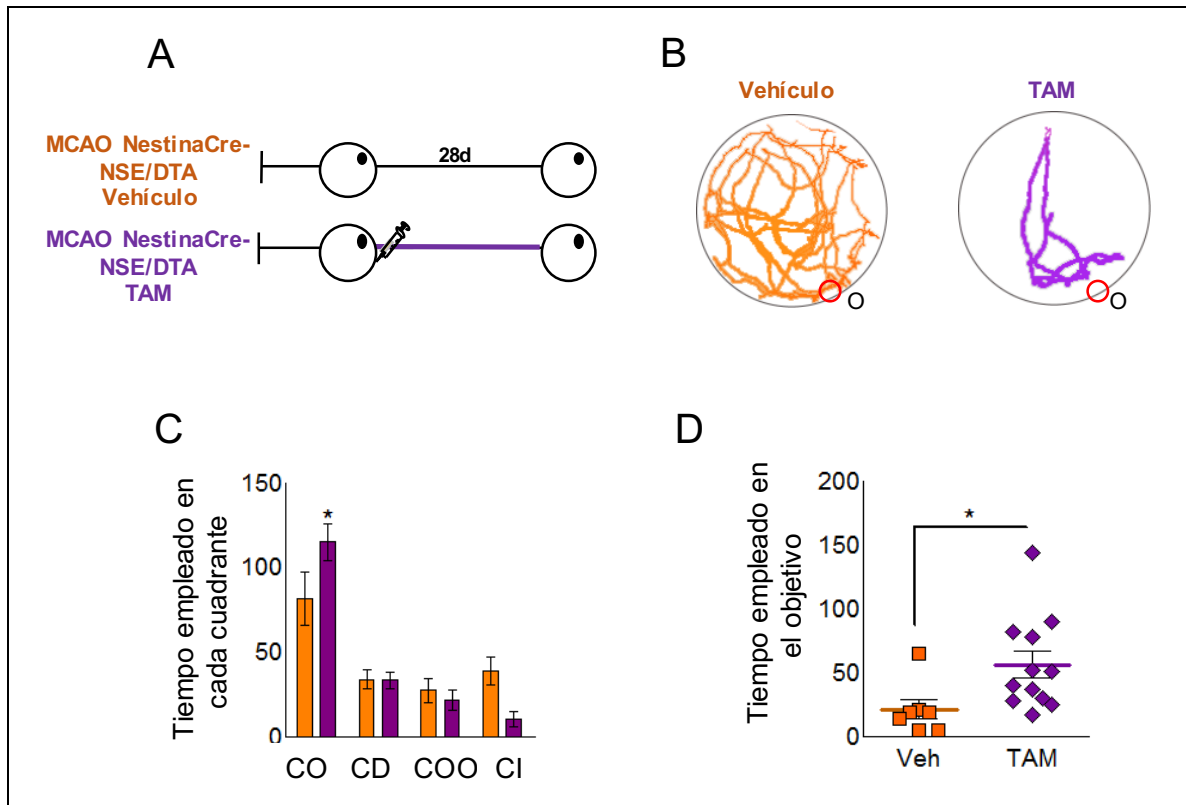


Figura 56. Recuperación de la memoria espacial tras ictus mediante estrategia génica. (A) Protocolo experimental para los paneles (B-D). (B) Trazados del comportamiento de búsqueda llevado a cabo por los animales isquémicos NestinaCre^{ERT2}-NSE/ATD tratados con vehículo (izquierda) o tamoxifeno (TAM) (derecha) el día del test. (C) Tiempo empleado en cada cuadrante del test por los animales isquémicos tratados con vehículo (naranja) o TAM (morado). Se identificó una interacción significativa entre los diferentes cuadrantes y el tratamiento con TAM en los animales isquémicos NestinaCre^{ERT2}-NSE/ATD ($(F_{(3,68)} = 4.41; p = 0.0068)$; $*p < 0.05$ vs. NestinaCre^{ERT2}-NSE/ATD vehículo CO; Bonferroni post-test). (D) Tiempo empleado alrededor del cuadrante objetivo en el día del test ($*p < 0.05$ vs. MCAO NestinaCre^{ERT2}-NSE/ATD vehículo; vehículo, $n = 7$; tamoxifeno, $n = 12$). CO Cuadrante objetivo, CD Cuadrante derecho, CI Cuadrante izquierdo y CCO Cuadrante contrario al objetivo. Estadística: (C) ANOVA de dos vías no paramétrico seguido de un post-test de Bonferroni; (D) test t de Student no pareado seguido de un test de dos colas Mann-Whitney.

En su conjunto, estos resultados muestran la contribución de la respuesta neurogénica tras isquemia cerebral en el desarrollo del deterioro cognitivo específico del hipocampo que puede deberse, al menos en parte, a la remodelación aberrante de los circuitos hipocampales donde reside la memoria.

5

RESULTADOS PARTE II

5.2 PAPEL DEL RECEPTOR DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS (AHR) EN LA MORFOLOGÍA DE LAS NUEVAS NEURONAS GRANULARES Y LA MEMORIA DEPENDIENTE DEL HIPOCAMPO

5.2.1 Papel de AhR en la memoria hipocampal

El receptor de hidrocarburos aromáticos tradicionalmente se ha vinculado con los efectos deletéreos sistémicos de los contaminantes ambientales y compuestos xenobióticos (Fernandez-Salguero et al., 1995; Fernandez-Salguero et al., 1996; Mandal, 2005; Mulero-Navarro and Fernandez-Salguero, 2016; Murray et al., 2014; Sánchez-Martín et al., 2011). Por otro lado, diversos estudios han puesto de manifiesto que, ante la exposición a estos compuestos, AhR podría participar en el desarrollo de alteraciones en determinadas funciones del sistema nervioso central, como es la función cognitiva (Kimura et al., 2017; Latchney et al., 2013).

5.2.1.1 Defectos en la memoria contextual en ausencia de AhR

Con el objetivo de dilucidar el papel que AhR podría desempeñar en la memoria dependiente del hipocampo, se sometieron animales p60 AhR^{-/-} y AhR^{+/+} a una batería de tests de memoria específicos de la formación hipocampal. En primer lugar, los animales se sometieron al test del condicionamiento al miedo contextual (CMC). En este test, no se encontraron diferencias entre los animales AhR^{-/-} y AhR^{+/+} en cuanto a la respuesta al estímulo condicionado, indicando niveles similares en cuanto a la respuesta nociceptiva en ambos genotipos (Figura 57, B). Durante la fase de recuerdo, los animales AhR^{-/-} mostraron una reducción en la supresión de la actividad (Figura 57, C) así como una menor respuesta de congelación, tanto 1h como 24h tras el condicionamiento, respecto al grupo control (Figura 57, D-E). Estos datos indican que los animales AhR^{-/-} presentan un déficit en cuanto a la memoria de tipo contextual, de acuerdo con la literatura (Latchney et al., 2013).

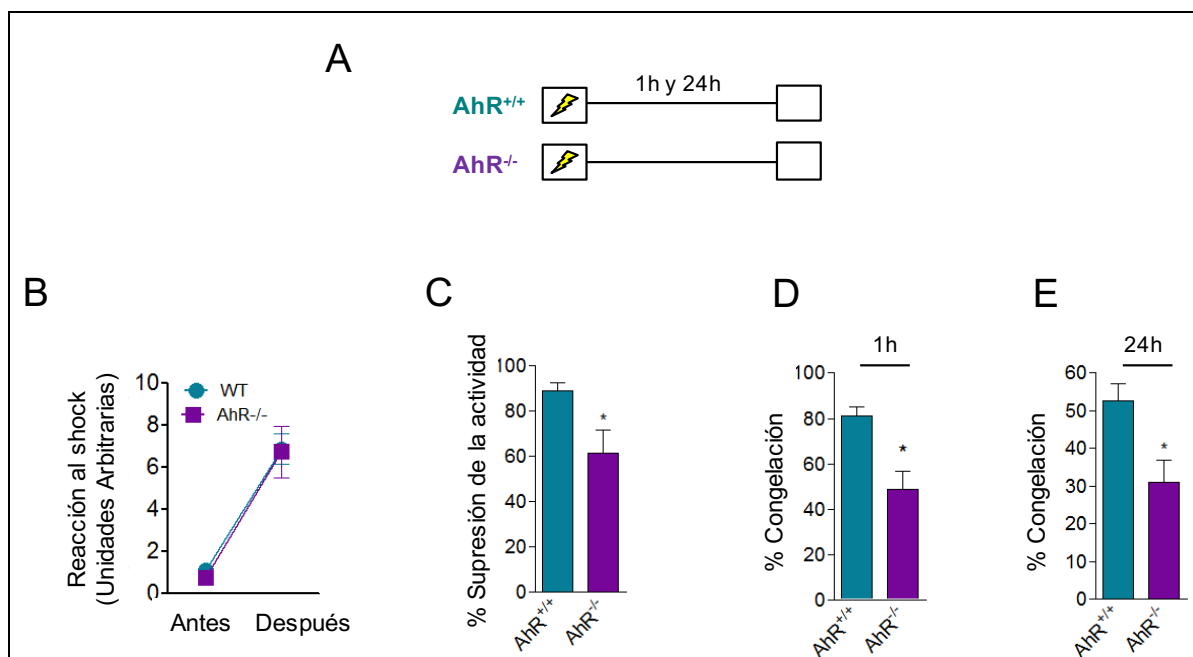


Figura 57. Alteraciones de la memoria contextual en ausencia de AhR. (A) Protocolo experimental para los paneles (B-E). (B) Reacción antes y después del estímulo aversivo (

0.6mAx3). (C) Porcentaje de supresión de la actividad después del estímulo aversivo (* $p < 0.05$ vs. $AhR^{+/+}$; $n = 7-8$ animales por grupo). (D-E) Porcentaje de respuesta de congelación en los animales $AhR^{+/+}$ y $AhR^{-/-}$ 1h (D) ó 24h (E) tras el condicionamiento al miedo contextual (* $p < 0.05$ vs. $AhR^{+/+}$; $n = 7-8$ animales por grupo). Estadística: (A) ANOVA de dos vías no paramétrico seguido de un post-test de Bonferroni. (C-E) test t de Student no pareado seguido de un test de dos colas Mann-Whitney.

5.2.1.2 Defectos en la discriminación de patrones en ausencia de *AhR*

A continuación se llevó a cabo una serie de tests en los que se evaluaba la capacidad de discriminación de patrones, como son el test del reconocimiento del objeto nuevo (RON) y el test de la nueva localización del objeto (NLO). Respecto al primero, durante la fase de entrenamiento (con 2 objetos similares), no se observó preferencia por ninguno de los dos objetos en ambos genotipos (datos no mostrados); sin embargo, durante la fase de recuerdo, mientras que los animales $AhR^{+/+}$ presentaban una exploración preferencial hacia el objeto nuevo, los animales $AhR^{-/-}$ no eran capaces de discriminar la presencia de éste (Figura 58, B) ya que exploraban ambos objetos por igual. En cuanto al NLO, si bien en la fase de entrenamiento tanto los animales $AhR^{-/-}$ como los $AhR^{+/+}$ no mostraron preferencias hacia ninguno de los 2 objetos, en la fase de recuerdo, los animales $AhR^{+/+}$ mostraban una preferencia hacia el objeto que se había desplazado, comportamiento que no se observaba en los $AhR^{-/-}$, los cuales exploraban ambas localizaciones por igual (Figura 58, D).

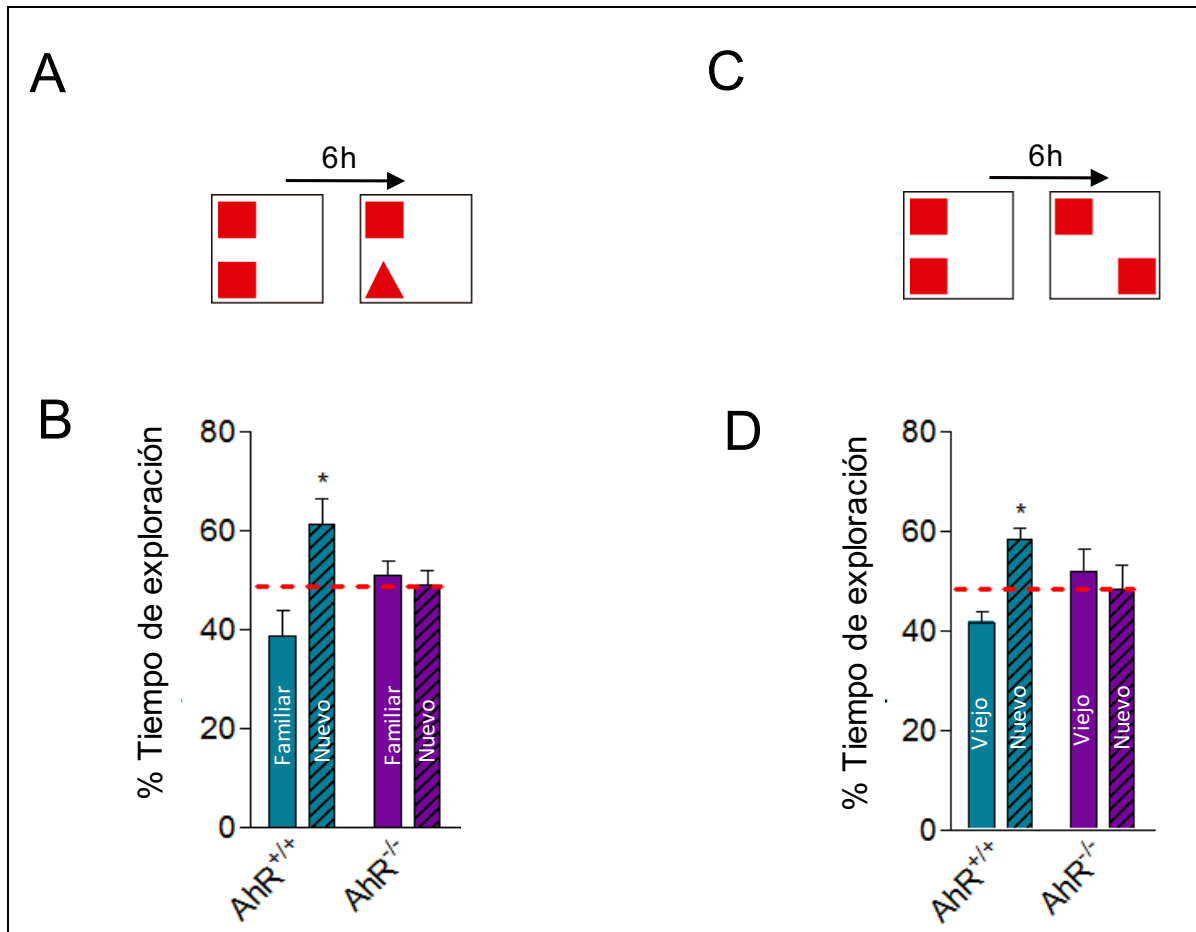


Figura 58. Alteraciones en la discriminación de patrones en ausencia de AhR. (A) Protocolo experimental para el panel (B). (B) Porcentaje del tiempo de exploración entre el objeto familiar y el nuevo objeto por los animales $AhR^{+/+}$ y $AhR^{-/-}$ 6h después de la fase de entrenamiento. Se identificó una interacción significativa entre el objeto y el genotipo ($(F_{(1,18)} = 7.46; *p < 0.01$ vs. $AhR^{+/+}$; Bonferroni post-test; $n = 7-8$ animales por grupo). (C) Protocolo experimental para el panel (D). (D) Porcentaje del tiempo de exploración entre la localización vieja y nueva del objeto por los animales $AhR^{+/+}$ y $AhR^{-/-}$ 6h después de la fase de entrenamiento. Se identificó una interacción significativa entre la localización y el genotipo ($(F_{(1,42)} = 7.93; *p < 0.01$ vs. $AhR^{+/+}$; Bonferroni post-test; $n = 7-8$ animales por grupo). Estadística: (B y D) ANOVA de dos vías no paramétrico seguido de un post-test de Bonferroni.

5.2.1.3 Defectos en la memoria espacial en ausencia de AhR

Por último, para completar el estudio de los diferentes tipos de memoria en los que el hipocampo se encuentra directamente implicado, se decidió explorar la memoria de tipo espacial. Para ello se emplearon los test del laberinto en Y y el laberinto de Barnes. Respecto al primero, no se observaron diferencias en la memoria de trabajo, calculada como el porcentaje de alternancias espontáneas (AE) (Figura

59, B). Sin embargo, los animales $AhR^{-/-}$ no mostraron ninguna preferencia hacia el brazo que permaneció cerrado durante la fase de entrenamiento a diferencia de los animales $AhR^{+/+}$ que sí lo hicieron (**Figura 59, C**). En el laberinto de Barnes, tanto los animales $AhR^{-/-}$ como los $AhR^{+/+}$ emplearon el mismo tiempo en encontrar la caja de escape a lo largo de todas las sesiones del entrenamiento (**Figura 59, F**). Sin embargo, 24h tras la última sesión de entrenamiento, los animales $AhR^{+/+}$ permanecían la mayor parte del tiempo alrededor del agujero objetivo, mientras que los animales $AhR^{-/-}$ mostraron un comportamiento totalmente errático (**Figura 59, G**). Todos estos resultados indican que el receptor AhR resulta fundamental para el correcto desarrollo de la memoria dependiente de hipocampo.

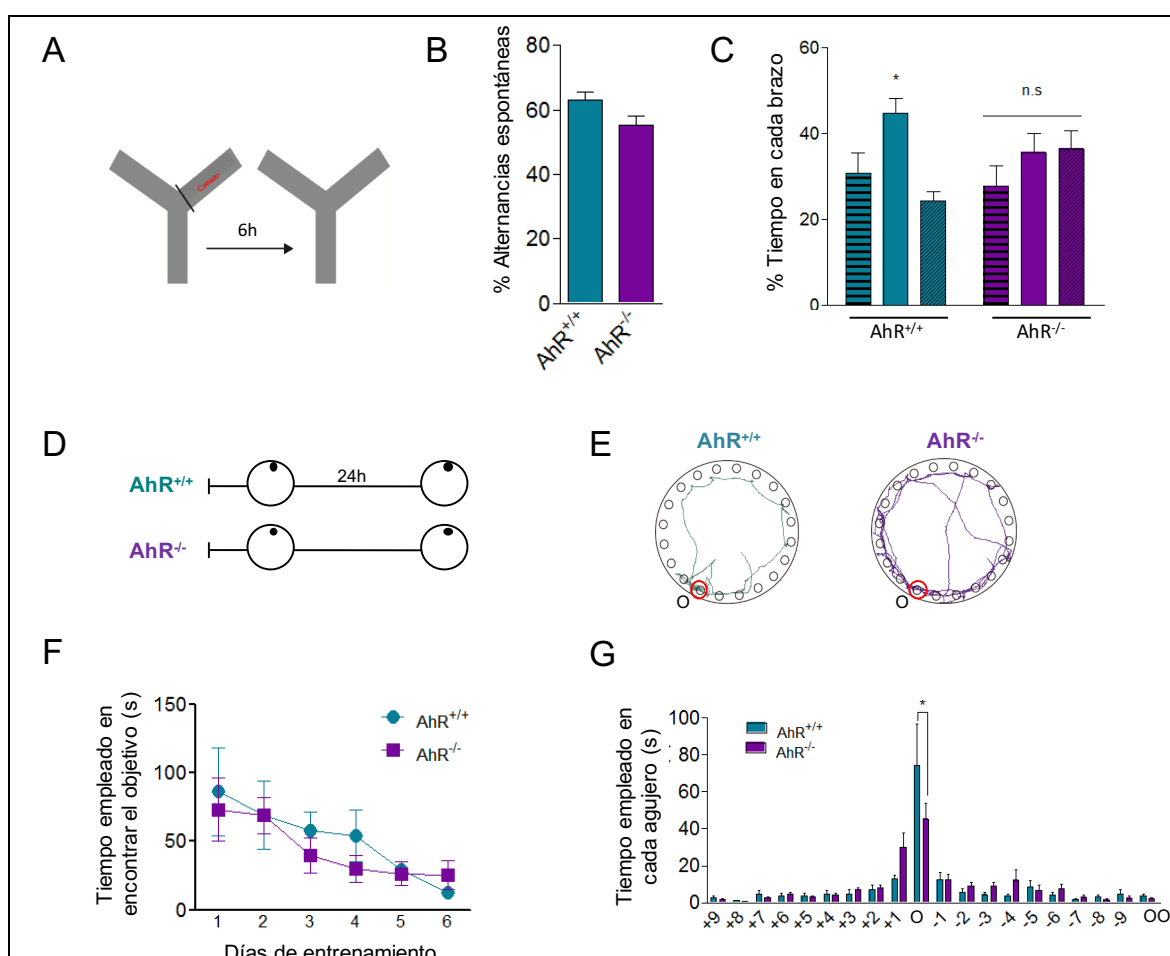


Figura 59. Alteraciones en la memoria espacial en ausencia de AhR. (A) Protocolo experimental para los paneles (B-C). (B) Porcentaje de alternancias espontáneas en el laberinto en Y por los

animales AhR^{+/+} y AhR^{-/-}. **(C)** Porcentaje de tiempo empleado en cada brazo en el test del laberinto en Y por los animales AhR^{+/+} y AhR^{-/-} 6h después de la fase de entrenamiento. Se identificó una interacción significativa entre cada brazo y el genotipo (($F_{(2,27)} = 3,84$; * $p < 0.05$ vs. AhR^{+/+}; Bonferroni post-test; n=7-8 animales por grupo). **(D)** Protocolo experimental para los paneles **(E-G)**. **(E)** Trazados del comportamiento de búsqueda llevado a cabo por los animales AhR^{+/+} (izquierda) y AhR^{-/-} (derecha) durante la fase de recuerdo. **(F)** Tiempo empleado por los animales AhR^{+/+} y AhR^{-/-} en encontrar el agujero objetivo durante la fase de entrenamiento. Se identificó una interacción significativa entre las sesiones de entrenamiento (($F_{(2,27)} = 3,84$; * $p < 0.05$ vs. días de entrenamiento; Bonferroni post-test; n=7-8 animales por grupo). **(G)** Tiempo empleado por los animales AhR^{+/+} y AhR^{-/-} en cada agujero durante la fase de recuerdo. (($F_{(19,260)} = 1,83$; * $p < 0.05$ vs. AhR^{+/+}; Bonferroni post-test; n=7-8 animales por grupo). Estadística: **(C, F y G)** ANOVA de dos vías no paramétrico seguido de un post-test de Bonferroni.

5.2.2 Papel de AhR en la neurogénesis y su relación con la memoria dependiente del hipocampo

Dado que AhR es un factor de transcripción perteneciente a la superfamilia bHLH, los déficits en la memoria hipocampal previamente identificados en los animales AhR^{-/-} podrían deberse a alteraciones en la neurogénesis hipocampal, tal como previamente se ha sugerido en otras investigaciones (Latchney et al., 2013).

5.2.2.1 Alteraciones en la proliferación hipocampal en ausencia de AhR

En primer lugar, el análisis temporal (p30, p60 y p100) de las células proliferativas Ki67⁺ en la ZSG de los animales AhR^{+/+} y AhR^{-/-} permitió identificar cambios dependientes de la edad entre los distintos genotipos. Los animales AhR^{-/-}, en comparación con los AhR^{+/+}, presentaron mayores niveles de células Ki67⁺ tanto a p30 como p60; sin embargo, se observó una disminución significativa a p100 **(Figura 60, B)**. Estos resultados se confirmaron tras la administración de cuatro pulsos de BrdU (5-bromo-2'-deoxiuridina) cada 2h. Veinticuatro horas tras la última inyección, los animales AhR^{-/-} de nuevo presentaron mayores niveles de células BrdU⁺ a p30 y p60, pero una reducción a p100 en comparación con los AhR^{+/+} **(Figura 60, D)**.

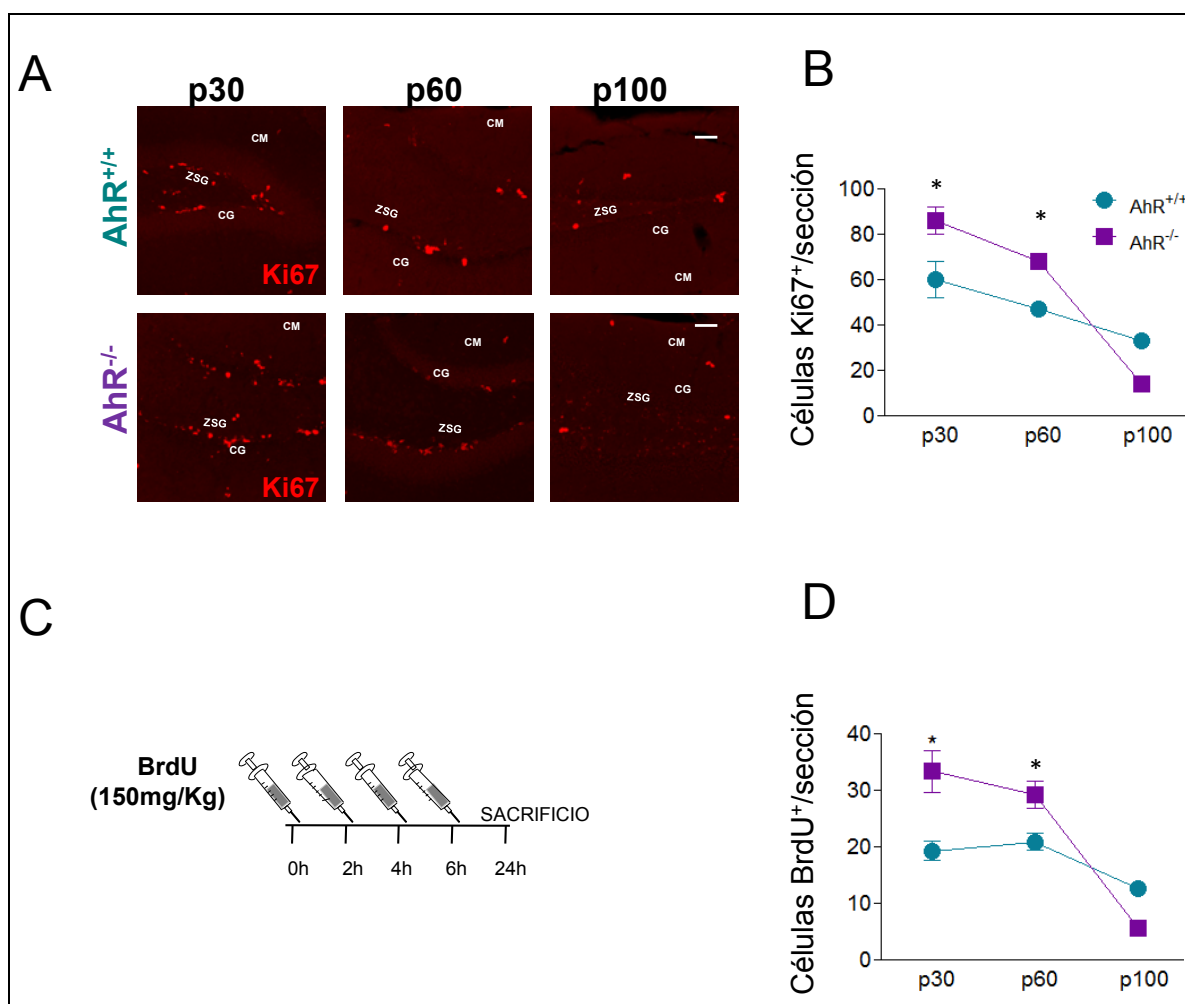


Figura 60. Cambios proliferativos dependientes de la edad en ausencia de AhR. (A) Imágenes representativas de las células Ki67⁺ en los animales AhR^{+/+} y AhR^{-/-} a diferentes tiempos. (B) Número de las células Ki67⁺ en los animales AhR^{+/+} y AhR^{-/-} a p30, p60 y p100. Se identificó una interacción significativa entre la edad y el genotipo ($(F_{(2, 28)}=8,56; *p<0.05$ vs. AhR^{+/+}; Bonferroni post-test; n=5-6 animales por grupo). (C) Protocolo experimental para el panel (D). (D) Número de las células BrdU⁺ en los animales AhR^{+/+} y AhR^{-/-} a p30, p60 y p100. Se identificó una interacción significativa entre la edad y el genotipo ($(F_{(2, 24)}=9,51; *p<0.05$ vs. AhR^{+/+}; Bonferroni post-test; n=5-6 animales por grupo). Zona subgranular: ZSG, capa granular: CG, capa molecular: CM. Escala = 100µm. Estadística: (B y D) ANOVA de dos vías no paramétrico seguido de un post-test de Bonferroni.

5.2.2.2 Cambios en el nicho neurogénico hipocampal en ausencia de AhR

Nuestros resultados muestran que la regulación de la neurogénesis por parte del receptor AhR parece ser dependiente de la edad. Puesto que a la edad a la que se llevaron a cabo los test de memoria coincide con mayores niveles de neurogénesis

hipocampal (p60) observado en ausencia de AhR, los déficits cognitivos encontrados en los animales AhR^{-/-} no parecen ser debidos a una reducción en los niveles neurogénicos como previamente se había sugerido (Latchney et al., 2013).

Para corroborar estos resultados, se analizó en siguiente lugar el número de precursores neuronales en los ratones WT y AhR^{-/-}. Mediante un análisis por citometría de flujo de las células Nestin⁺/BrdU⁺ se observó que los animales AhR^{-/-} p60 presentaban casi un 60% incrementados los niveles de precursores neuronales con capacidad proliferativa (Nestin⁺/BrdU⁺) en el GD en comparación con los animales AhR^{+/+} (Figura 61, A) 24h tras la inyección de BrdU. Estos datos se corroboraron con el análisis de los distintos tipos de precursores neuronales, como son los de tipo-1 (Nestin⁺/GFAP⁺) y tipo-2 (Nestin⁺/GFAP⁻). Igualmente, se analizaron sus correspondientes subpoblaciones en fase de proliferación tanto a p30 como a p100. A p30, los animales AhR^{-/-} presentaron mayores niveles tanto de los progenitores de tipo 1 como tipo 2 (Figura 61, D y F izquierda) y de sus respectivas subpoblaciones con capacidad proliferativa (Figura 61, E y G izquierda). Sin embargo, a p100, mientras que los niveles de la población de tipo 1 no presentaba diferencias (Figura 61, D derecha), los niveles de la población de tipo 2 (Figura 61, F derecha) y las subpoblaciones proliferativas tanto tipo 1 como tipo 2 se encontraban reducidas en comparación con los animales AhR^{+/+} (Figura 61, E y G derecha).

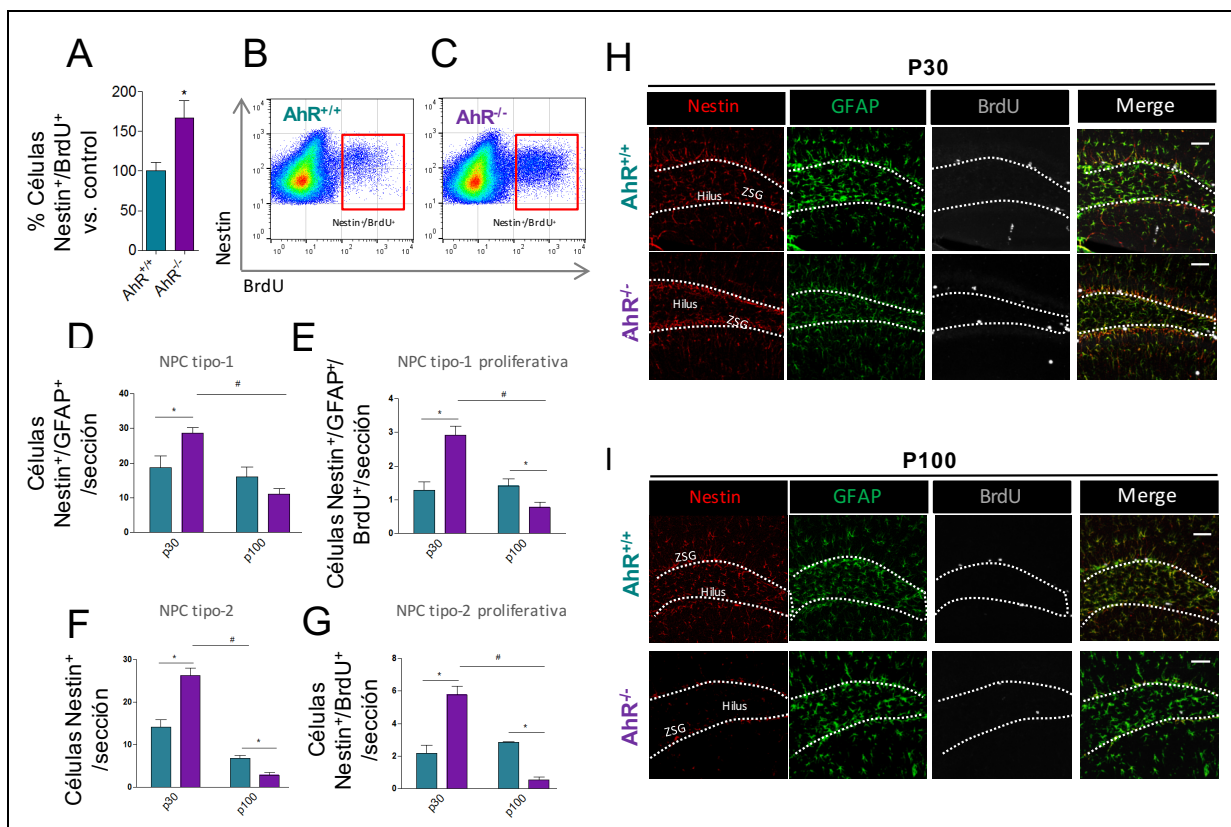


Figura 61. Cambios en el pool de células madre hipocámpales dependientes de la edad en ausencia de AhR. (A) Cuantificación del número de células Nestin⁺/BrdU⁺ por citometría de flujo 24h tras la administración de BrdU (*p<0.05 vs. AhR^{+/+}; n=6 animales por grupo). (B-C) Representación de las células marcadas con Nestin y BrdU del giro dentado de los animales AhR^{+/+} (B) y AhR^{-/-} (C). (D-E) Cuantificación de las células NPC tipo 1 (Nestin⁺/GFAP⁺) (D) y tipo 2 (Nestin⁺/GFAP⁺) (E) y su capacidad proliferativa (F y G) en el giro dentado de los animales AhR^{+/+} y AhR^{-/-} a p30 y p100 (*p<0.05 vs. AhR^{+/+}; #p<0.05 vs. AhR^{-/-}; n=4-6 animales por grupo). (H e I) Imágenes representativas de las células Nestin⁺/GFAP⁺/BrdU⁺ en los animales AhR^{+/+} y AhR^{-/-} a p30 (H) y p100 (I). Zona subgranular: ZSG. Escala = 50µm. Estadística: (A y D-G) test t de Student no pareado seguido de un test de dos colas Mann-Whitney.

5.2.2.3 Alteraciones en la generación hipocámpal de nuevas neuronas en ausencia de AhR

A continuación, para comprobar si el incremento en cuanto a los niveles de proliferación en los animales AhR^{-/-} se acompañaba de niveles elevados de nuevas neuronas inmaduras, se llevó a cabo un análisis del número de neuroblastos en la ZSG. Apoyando los resultados anteriores, los animales AhR^{-/-} p60 presentaban mayores niveles de células DCX⁺ (Figura 62, B).

A continuación se quiso comprobar si esta mayor proporción de nuevas células generadas en los animales $AhR^{-/-}$ acababan finalmente formando parte de los circuitos hipocampales. Para ello, se inyectó intraperitonealmente BrdU a los ratones $AhR^{+/+}$ y $AhR^{-/-}$ a p60 y 28 días tras la última administración de BrdU, se analizó la doble colocalización entre BrdU y el marcador de neurona madura calbindina. De nuevo, los animales $AhR^{-/-}$ presentaron mayores niveles tanto del número total de células $BrdU^{+}$ (Figura 62, D) como de las doble positivas $BrdU^{+}/calbindina^{+}$ (Figura 62, E) en comparación con sus respectivos controles, indicando que la ausencia de AhR promueve la generación de nuevas neuronas en el hipocampo. Además, ambos grupos mostraron porcentajes similares en cuanto a las células $BrdU^{+}/calbindina^{+}$ (65% $AhR^{-/-}$ vs. 76% $AhR^{+/+}$), indicando que la ausencia de AhR no modifica la tasa de diferenciación hacia diferentes linajes celulares durante la neurogénesis hipocampal.

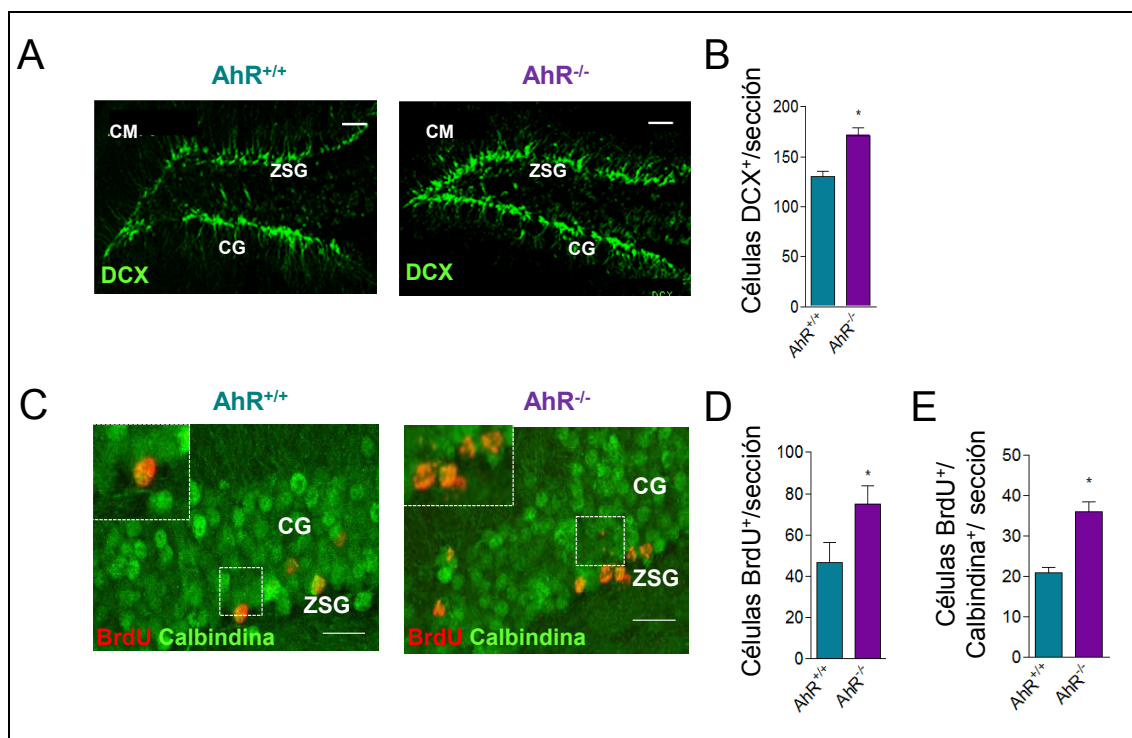


Figura 62. Cambios en el pool de neuroblastos y nuevas neuronas hipocampales en ausencia de AhR. (A) Imágenes representativas de los neuroblastos en el GD de los animales $AhR^{+/+}$

(izquierda) y AhR^{-/-} (derecha). **(B)** Cuantificación del número de células DCX⁺ en los animales AhR^{+/+} y AhR^{-/-} (*p<0.05 vs. AhR^{+/+}; n=6-8 animales por grupo). **(C)** Imágenes representativas de las nuevas neuronas integradas en el GD de los animales AhR^{+/+} (izquierda) y AhR^{-/-} (derecha). **(D-E)** Cuantificación del número de células BrdU⁺ **(D)** y BrdU⁺/Calbindina⁺ **(E)** en los animales AhR^{+/+} y AhR^{-/-} (*p<0.05 vs. AhR^{+/+}; n=7-9 animales por grupo). Zona subgranular: ZSG, capa granular: CG, capa molecular: CM. Escala = 50µm en **(A)** y 30 µm en **(C)**. Estadística: **(B y D-E)** test t de Student no pareado seguido de un test de dos colas Mann-Whitney.

5.2.2.4 Alteraciones neurogénicas en la zona subventricular en ausencia de

AhR

Para confirmar que a p60 AhR es un modular negativo de la neurogénesis adulta, se decidió analizar los niveles de neurogénesis en la otra región neurogénica del cerebro adulto, la zona subventricular (ZSV). En este caso, aunque en los animales AhR^{-/-} no se encontraron diferencias en el número total de células BrdU⁺ **(Figura 63, B)**, mostraron incrementado el *pool* de células Nestin⁺ **(Figura 63, A)** así como la población de células madre en estado proliferativo Nestin⁺/BrdU⁺ **(Figura 63, C)**, células Ki67⁺ **(Figura 63, D)** y volumen del marcador DCX **(Figura 63, E)**. Estos resultados sugieren que la ausencia de AhR promueve un fenotipo similar en ambas regiones neurogénicas.

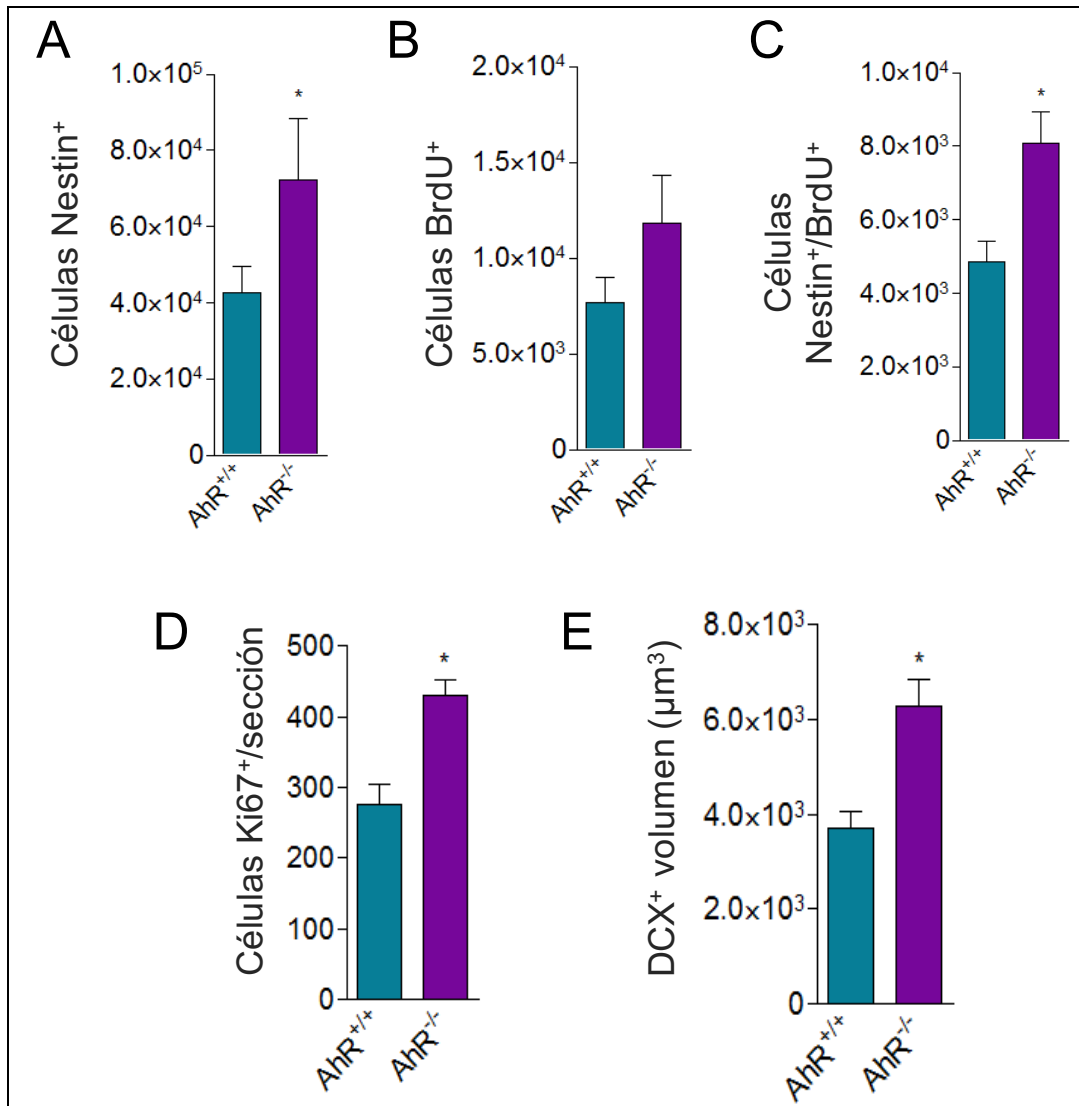


Figura 63. Cambios en la neurogénesis de la zona subventricular en ausencia de AhR. Cuantificación del número de células Nestin⁺ (A), BrdU⁺ (B) y Nestin⁺/BrdU⁺ (C) por citometría de flujo 24h tras la administración de BrdU (*p<0.05 vs. AhR^{+/+}; n=5 animales por grupo). Cuantificación del número de células Ki67⁺ (D) y del volumen del marcaje DCX⁺ (E) mediante el análisis por inmunofluorescencia en los animales AhR^{+/+} y AhR^{-/-} (*p<0.05 vs. AhR^{+/+}; n=5 animales por grupo). Estadística: (A-E) test t de Student no pareado seguido de un test de dos colas Mann-Whitney.

Por tanto, a pesar del papel que previamente se había sugerido para AhR (Latchney et al., 2013), estos resultados indican que, a p30 y p60, la ausencia de AhR potencia la neurogénesis hipocampal, descartándose así que los déficits de memoria observados en los animales AhR^{-/-} a p60 pudieran deberse a una reducción de los niveles de la neurogénesis hipocampal adulta.

5.2.3 Papel de AhR en la morfología de las neuronas granulares hipocampales

En el contexto del efecto anterógrado de la memoria, niveles elevados de neurogénesis se ha correlacionado con una mayor capacidad cognitiva (Kempermann et al., 1007; van Praag et al., 2002). Dado que la ausencia de AhR estaba promoviendo en paralelo alteraciones en la memoria hipocampal y una potenciación de todas las etapas neurogénicas, y teniendo en cuenta el papel de los ortólogos de AhR en el control de la morfología neuronal y de la arborización dendrítica en invertebrados (Qin and Powell-Coffman, 2004; Crews and Brenman, 2006; Kim et al., 2006; Smith et al., 2013), nos planteamos si los déficits cognitivos observados en ausencia de AhR podrían deberse a alteraciones en la morfología de las neuronas granulares hipocampales y su consiguiente integración.

5.2.3.1 Cambios morfológicos en las neuronas granulares en ausencia de AhR

En primer lugar, se llevó a cabo un análisis morfológico de las neuronas granulares maduras en los giros dentados de los animales AhR^{+/+} y AhR^{-/-} mediante la tinción histológica de Golgi-Cox. En comparación con los animales AhR^{+/+}, el análisis de sholl mostró que las neuronas granulares del GD que carecían de AhR presentaban un árbol dendrítico con un patrón de ramificación más elevado (**Figura 64, B**), un incremento en cuanto a la longitud dendrítica total (**Figura 64, C**) junto con un mayor número de espinas dendríticas (**Figura 64, D**), respaldando de este modo el papel de AhR en la regulación de la morfología neuronal.

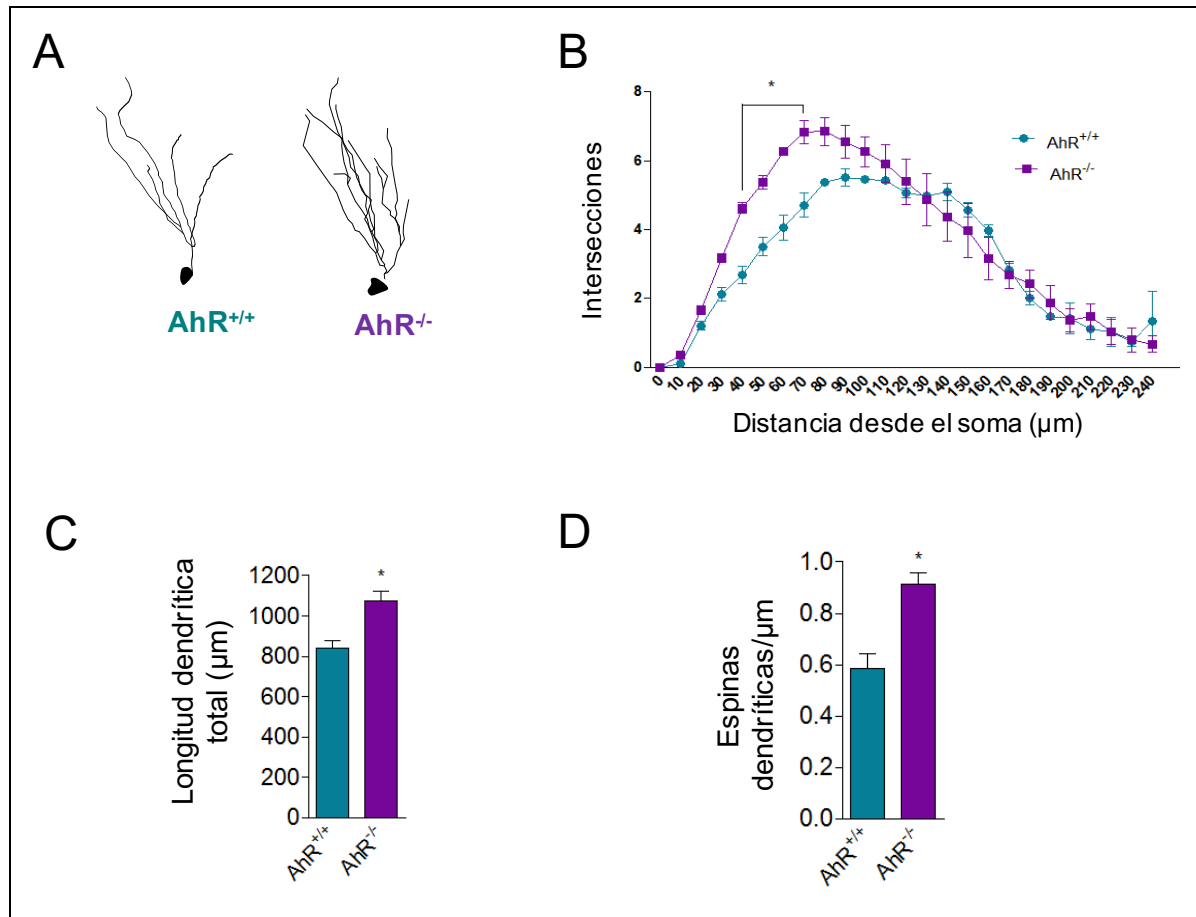


Figura 64. Morfología aberrante en las neuronas granulares en ausencia de AhR. (A) Imágenes representativas de las neuronas granulares en los animales AhR^{+/+} (izquierda) y AhR^{-/-} (derecha) por tinción Golgi-Cox. (B) Análisis sholl de las neuronas granulares de los animales AhR^{+/+} y AhR^{-/-}. Se identificó una interacción significativa entre la distancia y el genotipo ($(F_{(24, 125)}=2,45; *p<0.05$ vs. AhR^{+/+}; n=4-5 animales por grupo). (C) Cuantificación de la longitud dendrítica total de las neuronas granulares en los animales AhR^{+/+} y AhR^{-/-} (* $p<0.05$ vs. AhR^{+/+}; n=4-5 animales por grupo). (D) Cuantificación de las espinas dendríticas en el segmento externo de la capa molecular de las neuronas granulares de los animales AhR^{+/+} y AhR^{-/-} (* $p<0.05$ vs. AhR^{+/+}; n=4-5 animales por grupo). Estadística: (B) ANOVA de dos vías no paramétrico seguido de un post-test de Bonferroni; (C y D) test t de Student no pareado seguido de un test de dos colas Mann-Whitney.

5.2.3.2 Cambios morfológicos en las nuevas neuronas granulares en ausencia de AhR

Teniendo en cuenta la participación de AhR en la morfología neuronal y dado que la edad en la que observamos los déficits de memoria en los AhR^{-/-} coincide con el momento en que AhR actúa como regulador negativo de la neurogénesis hipocámpal, decidimos explorar si el patrón morfológico de las nuevas neuronas

generadas en ausencia de AhR se encontraba alterado, pudiendo establecer así una conectividad aberrante en los circuitos hipocampales, lo que podría explicar que los animales $AhR^{-/-}$ presentasen una neurogénesis incrementada al mismo tiempo que un déficit hipocampal. En primer lugar se llevó a cabo un análisis morfológico de las nuevas neuronas inmaduras (células DCX^{+}). Dichas células mostraban un patrón morfológico similar al observado en las neuronas granulares maduras determinado mediante la tinción Golgi-Cox, indicando que AhR ejerce el mismo efecto morfológico tanto a nivel de neurona madura como de nuevas neuronas. Así, los neuroblastos $AhR^{-/-}$ presentaban, por un lado, un mayor patrón de arborización dendrítica (**Figura 65, B**) pero un acortamiento de la longitud dendrítica apical (**Figura 65, C**). Además, el análisis de la distribución de las dendritas en las distintas capas del GD puso de manifiesto diferencias entre genotipos (**Figura 65, D**). Así, en comparación con los $AhR^{+/+}$, la ausencia de AhR produjo un incremento en cuanto a la arborización dendrítica en la capa granular, pero una disminución en la capa molecular.

Dado que los neuroblastos (células DCX^{+}) se consideran neuronas inmaduras y no totalmente integradas en los circuitos hipocampales, a continuación decidimos analizar la morfología que presentaban las nuevas neuronas maduras generadas durante la neurogénesis hipocampal adulta. Para ello, se llevó a cabo el marcaje de las nuevas neuronas generadas desde su etapa más troncal mediante la liberación de partículas retrovirales portadoras del gen GFP en la región hilar de los animales $AhR^{+/+}$ y $AhR^{-/-}$ a p60. Veintiocho días tras la infección, el análisis *sholl* en las nuevas neuronas generadas e integradas reveló una mayor arborización dendrítica en las neuronas $AhR^{-/-}$ -GFP⁺ en comparación con las $AhR^{+/+}$ -GFP⁺, específicamente en la región más proximal (50-150µm desde el soma) (**Figura 65,**

F). Además, las neuronas $AhR^{-/-}$ -GFP⁺ mostraban una mayor longitud dendrítica total (**Figura 65, G**), junto con un acortamiento en cuanto a la longitud de la dendrita apical en comparación con las neuronas $AhR^{+/+}$ -GFP⁺ (**Figura 65, H**). Todos estos resultados ponen de manifiesto que la ausencia de AhR promueve una retracción de la dendrita apical junto con una alteración en cuanto a la ramificación del árbol dendrítico.

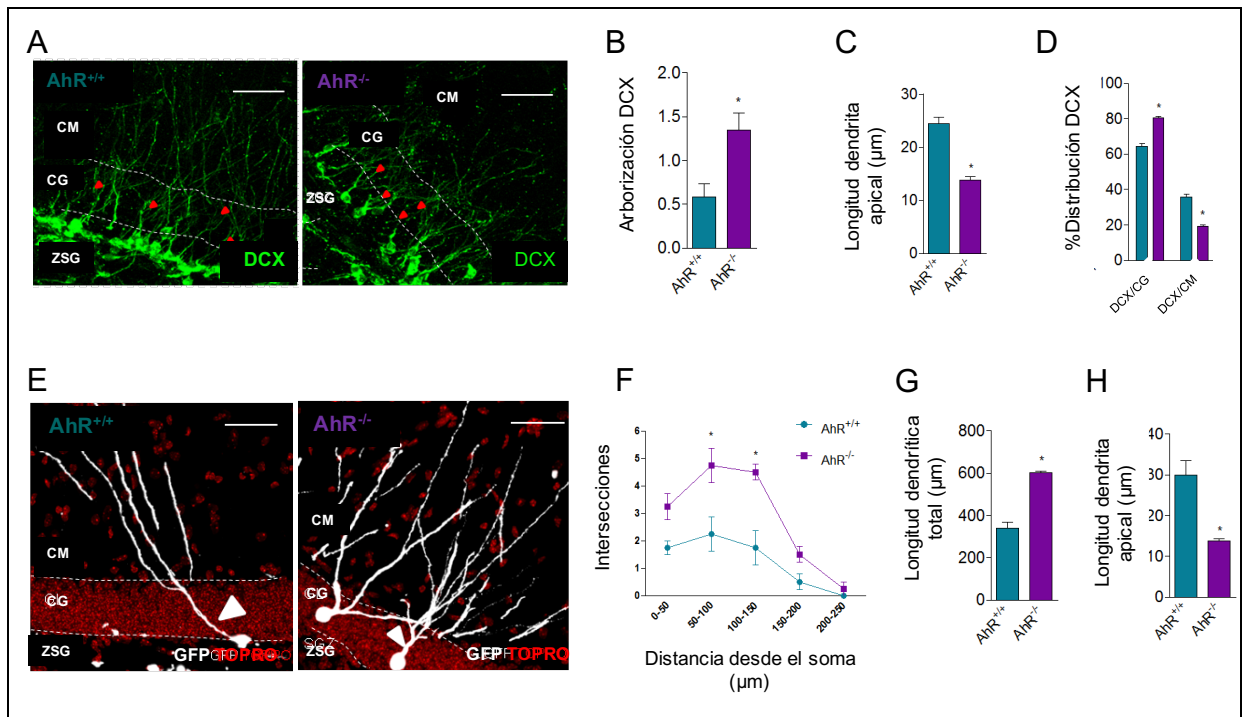


Figura 65. La ausencia de AhR en las nuevas neuronas granulares provoca una morfología aberrante. **(A)** Imágenes representativas de la morfología de los neuroblastos en los animales $AhR^{+/+}$ y $AhR^{-/-}$. **(B)** Arborización DCX en los animales $AhR^{+/+}$ y $AhR^{-/-}$ (*p<0.05 vs. $AhR^{+/+}$; n=5-6 animales por grupo). **(C)** Cuantificación de la longitud de la dendrita apical de los neuroblastos (*p<0.05 vs. $AhR^{+/+}$; n=5-6 animales por grupo). **(D)** Porcentaje de la distribución de DCX en la capa granular (CG) y molecular (CM) (*p<0.05 vs. $AhR^{+/+}$; n=5-6 animales por grupo). **(E)** Imágenes representativas de la morfología de las células GFP⁺ en los animales $AhR^{+/+}$ y $AhR^{-/-}$. **(F)** Análisis sholl de las neuronas granulares GFP⁺ de los animales $AhR^{+/+}$ y $AhR^{-/-}$. Se identificó una interacción significativa entre la distancia y el genotipo (($F_{(4, 30)}=3.02$; *p<0.05 vs. $AhR^{+/+}$; n=5 animales por grupo). **(G)** Cuantificación de la longitud dendrítica total de las neuronas GFP⁺ (*p<0.05 vs. $AhR^{+/+}$; n=5 animales por grupo). **(H)** Cuantificación de la longitud de la dendrita apical de las células GFP⁺ (*p<0.05 vs. $AhR^{+/+}$; n=5 animales por grupo). Zona subgranular: ZSG, capa granular: CG, capa molecular: CM. Escala = 50μm. Estadística: **(D y F)** ANOVA de dos vías no paramétrico seguido de un post-test de Bonferroni; **(B-C y G-H)** test t de Student no pareado seguido de un test de dos colas Mann-Whitney.

Finalmente, el análisis morfológico de las espinas dendríticas permitió identificar que la ausencia de AhR estaba provocando un incremento en cuanto a la densidad de las mismas en comparación con las neuronas AhR^{+/+}-GFP⁺ (**Figura 66, B**). A pesar de ello, el número de espinas dendríticas de tipo fungiforme, consideradas como las espinas maduras (Zhao et al., 2006), se encontraba reducido en las neuronas AhR^{-/-}-GFP⁺ respecto a las AhR^{+/+}-GFP⁺ (**Figura 66, C**), sugiriendo que AhR, aparte de sus implicaciones en la morfología neuronal, podría estar ejerciendo un papel en la correcta maduración e integración de las nuevas neuronas.

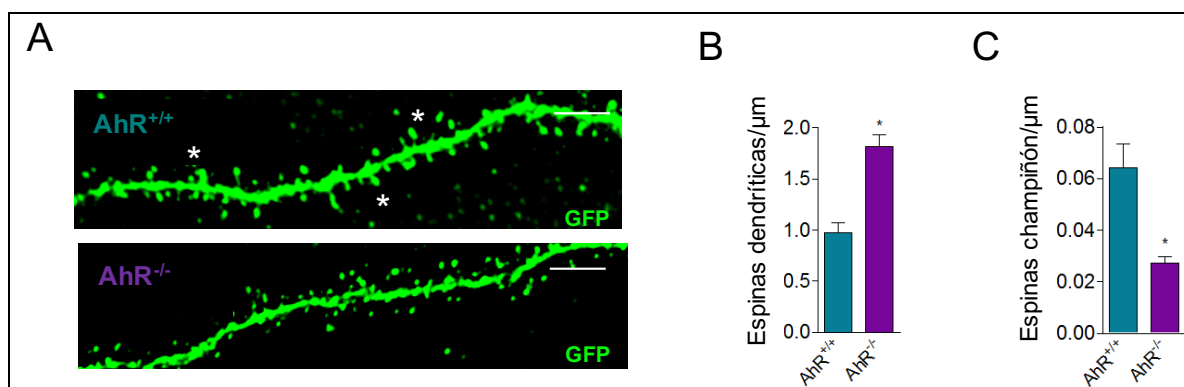


Figura 66. Efecto de AhR en la morfología de las espinas dendríticas en las nuevas neuronas granulares (A) Imágenes representativas de la densidad de espinas dendríticas GFP⁺ en el segmento externo de la capa molecular en cada grupo experimental. (B) Cuantificación del número de espinas dendríticas de las nuevas neuronas GFP⁺ de los animales AhR^{+/+} y AhR^{-/-} 28 días después de la infección (*p<0.05 vs. AhR^{+/+}; n=5 animales por grupo). (C) Cuantificación de la densidad de espinas dendríticas tipo fungiforme en las dendritas de las nuevas neuronas granulares GFP⁺ de los animales AhR^{+/+} y AhR^{-/-} (*p<0.05 vs. AhR^{+/+}; n=5 animales por grupo). Escala = 15μm. * = espinas dendríticas tipo fungiforme. Estadística: (B-C) test t de Student no pareado seguido de un test de dos colas Mann-Whitney.

5.2.4 Papel de AhR en las propiedades electrofisiológicas de las neuronas granulares del hipocampo

Los cambios morfológicos previamente observados parecen indicar que la ausencia de AhR podría igualmente estar modulando la capacidad de maduración e integración de las nuevas neuronas generadas durante la neurogénesis hipocampal adulta. Para dilucidar esta hipótesis, a continuación se llevó a cabo un estudio de las propiedades electrofisiológicas de las neuronas granulares de rodajas de cerebros de los animales AhR^{+/+} y AhR^{-/-}.

5.2.4.1 Alteraciones en la excitabilidad intrínseca en las neuronas granulares en ausencia de AhR

En primer lugar, comprobamos que la ausencia de AhR no estaba provocando alteraciones tanto en el potencial de membrana en reposo como en la resistencia de la membrana (**Figura 67, B-C**). A continuación, quisimos estudiar la capacidad de las neuronas granulares AhR^{-/-} de lanzar potenciales de acción, propiedad característica de las neuronas maduras (Deng et al., 2010). En condiciones de *whole-cell current clamp*, las neuronas granulares AhR^{-/-} mostraron una mayor tasa de disparo en respuesta a una corriente de despolarización (40-190 pA) en comparación con las neuronas AhR^{+/+} (**Figura 67, E**). Este patrón de excitabilidad neuronal, típico de neuronas inmaduras (Dieni et al., 2016), ponía de manifiesto alteraciones en cuanto al proceso de maduración neuronal que pudiera estar provocando la ausencia de AhR.

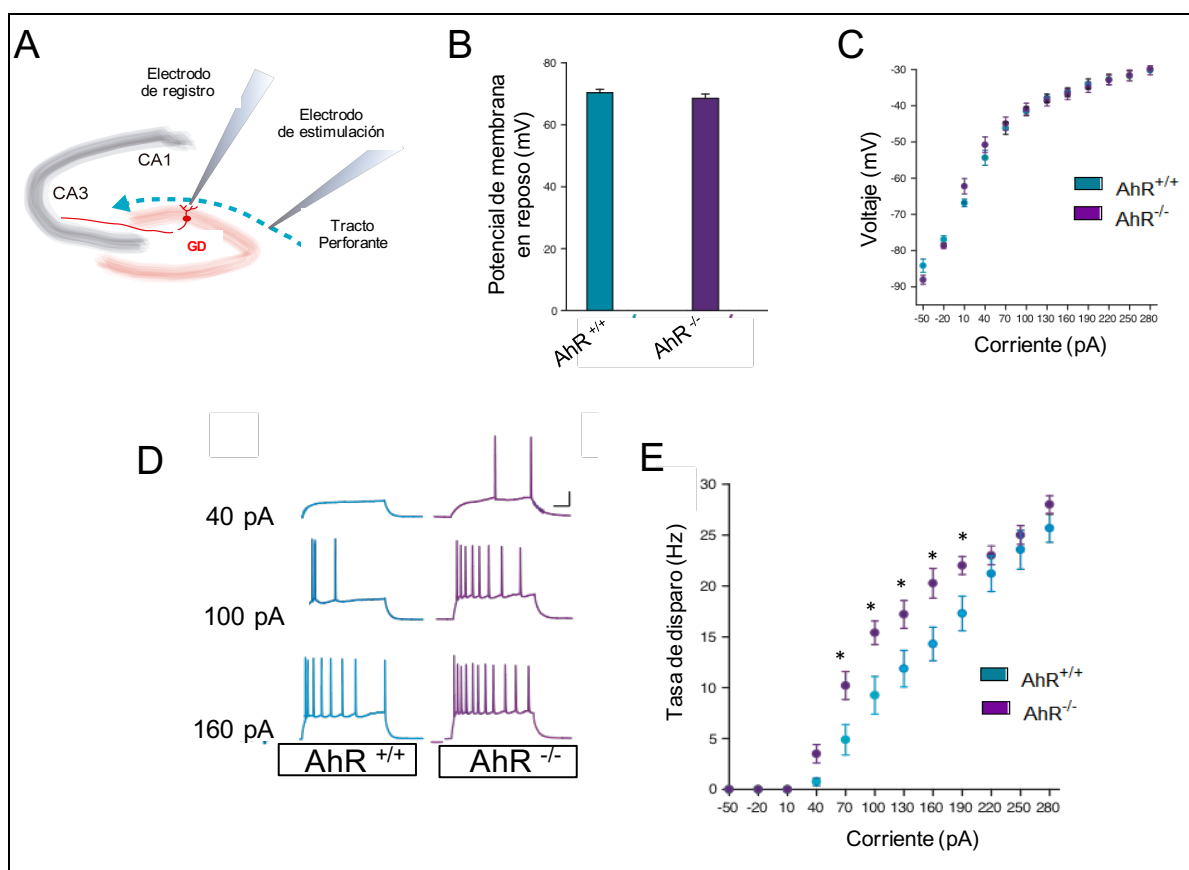


Figura 67. Modulación de las propiedades electrofisiológicas de las neuronas granulares por AhR. (A) Representación esquemática de una rodaja de hipocampo donde se muestran los electrodos de estimulación y registro. (B-C) Potencial de membrana en reposo (B) y voltaje (C) en las neuronas granulares de los animales AhR^{+/+} y AhR^{-/-}. (D) Representación de los potenciales de acción ante diferentes corrientes de despolarización en las neuronas granulares de los animales AhR^{+/+} y AhR^{-/-}. (E) Tasa de disparo de las neuronas granulares ante diferentes corrientes de despolarización en las neuronas granulares de los animales AhR^{+/+} y AhR^{-/-} (*p<0.05 vs. AhR^{+/+}; n=5 animales por grupo). Estadística: (E) test t de Student no pareado seguido de un test de dos colas Mann-Whitney.

5.2.4.2 Alteraciones en la maduración sináptica de las neuronas granulares en ausencia de AhR

Durante la maduración e integración neuronal se va produciendo progresivamente un incremento en cuanto al número de sinapsis activas, como resultado del cambio en el contenido de los receptores de glutamato AMPA (α -amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxazol-propionato) (Carlisle and Kennedy, 2005; Tada and Sheng, 2006; Paoletti et al., 2013; Chater and Goda, 2014). Para analizar el contenido global de

receptores AMPA funcionales, se llevó a cabo una cuantificación de la proporción de receptores AMPA/NMDA comparando las corrientes excitatorias postsinápticas (EPSCs) tanto de AMPA (-70mV) como de NMDA (N-metil-D-aspartato) (+40mV) en las neuronas granulares $AhR^{+/+}$ y $AhR^{-/-}$. Mediante esta aproximación se observó que las neuronas $AhR^{-/-}$ contenían una menor proporción AMPA/NMDA (Figura 68, B), indicando por tanto que estas neuronas presentaban en sus sinapsis una reducción en cuanto a los receptores AMPA respecto las neuronas $AhR^{+/+}$. De nuevo, estos resultados estaban indicando un fenotipo más inmaduro por parte de las neuronas $AhR^{-/-}$ respecto a las $AhR^{+/+}$.

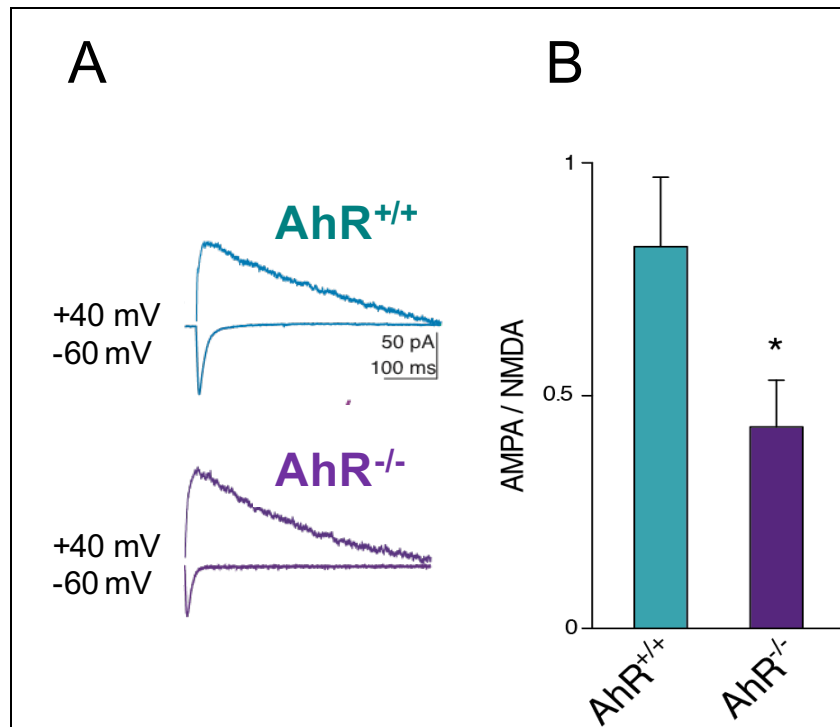


Figura 68. Cambios en la composición sináptica en ausencia de AhR. (A) Representación de las corrientes NMDA y AMPA registradas a +40 y -60mV, respectivamente, en las neuronas granulares de los animales $AhR^{+/+}$ y $AhR^{-/-}$. (B) Contenido de la relación AMPA/NMDA en las neuronas granulares de los animales $AhR^{+/+}$ y $AhR^{-/-}$ (* $p < 0.05$ vs. $AhR^{+/+}$; $n = 5$ animales por grupo). Estadística: (B) test t de Student no pareado seguido de un test de dos colas Mann-Whitney.

5.2.4.3 Alteraciones en la circuitería hipocampal en ausencia de AhR

Dadas las alteraciones tanto morfológicas como electrofisiológicas que presentaban las neuronas granulares en ausencia de AhR, decidimos explorar si estos cambios pudieran estar afectando a la capacidad de transmisión de la información en los circuitos hipocampales. Para ello, se llevó a cabo un análisis de la relación de pares de pulsos (*paired-pulse ratio (PPR)*) como medida de la capacidad de integración de las aferencias procedentes de la corteza entorrinal en las neuronas granulares. El PPR (EPSC2/EPSC1) registrado en los animales AhR^{-/-} fue significativamente mayor que la del grupo control (**Figura 69**). Estos resultados indican por tanto que la ausencia de AhR estaba provocando una disminución en cuanto a la probabilidad de liberación de neurotransmisor por parte de los axones procedentes de la corteza entorrinal que conectan con las dendritas de las neuronas granulares.

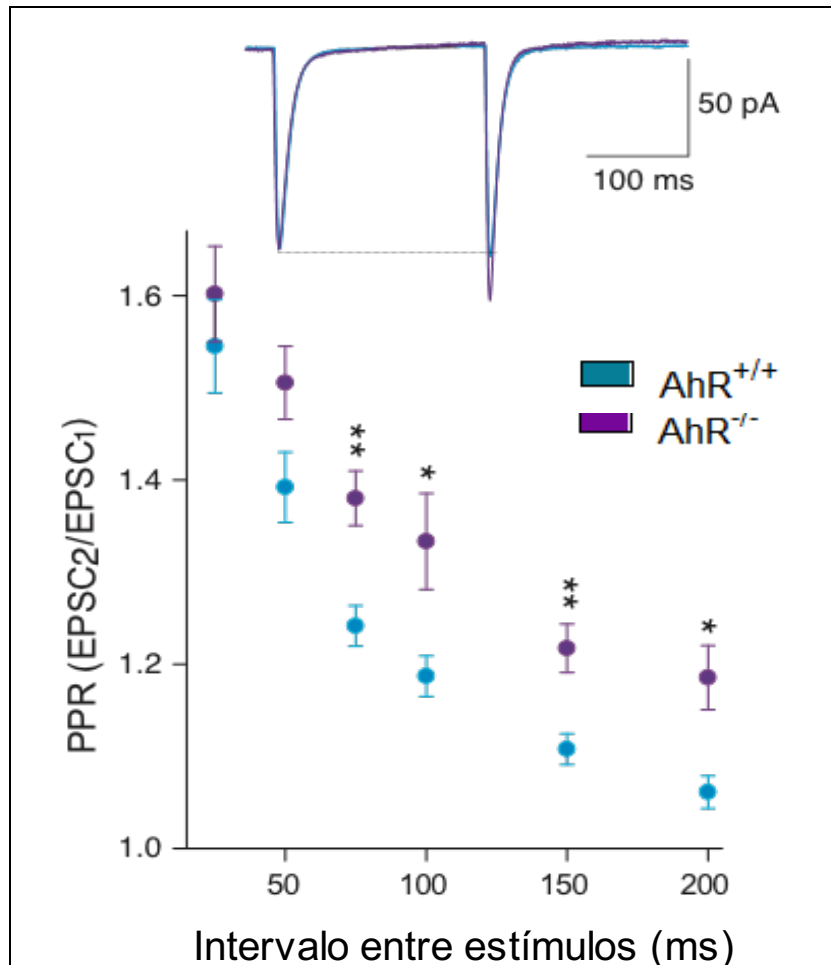


Figura 69. Cambios en la transmisión sináptica hipocámpal en ausencia de AhR. Registro representativo del pulso pareado (arriba) de los animales AhR^{+/+} (azul) y AhR^{-/-} (morado). Representación del pulso pareado en respuesta a diferentes intervalos entre estímulos (abajo) en los animales AhR^{+/+} y AhR^{-/-} (*p<0.05 vs. AhR^{+/+}; n=5 animales por grupo). Estadística: test t de Student no pareado seguido de un test de dos colas Mann-Whitney.

5.2.5 Alteraciones neurogénicas y en la memoria dependiente de hipocampo tras la delección específica de AhR en los progenitores neuronales

Dado que las alteraciones en la tasa neurogénica, en la morfología de las neuronas granulares y en la memoria hipocámpal descritas hasta ahora se han observado en condiciones de ausencia generalizada de AhR, quisimos corroborar que la ausencia de este receptor específicamente en las nuevas neuronas granulares generadas durante la neurogénesis hipocámpal adulta era responsable de todos los fenómenos previamente descritos.

5.2.5.1 Generación de animales con delección específica para AhR específicos en los progenitores neuronales hipocampales

Para llevar a cabo la delección condicional de AhR en los progenitores neuronales hipocampales, se generaron los denominados ratones transgénicos AhR KOci (*Knockout* condicionales-inducibles). Para ello, se cruzaron ratones que expresaban la enzima Cre recombinasa fusionada al ERT2 bajo el promotor del gen *nestin* (NestinaCre^{ERT2}) (Imayoshi et al., 2006), con ratones que presentaban el exón 2 del gen *ahr* flanqueado por secuencias loxP (AhR^{fl/fl}) (Walisser et al., 2005) (Figura 70, A). De este modo, y tras la administración de tamoxifeno, se consiguió escindir la secuencia del gen de *ahr* flanqueada, dando lugar a la delección de AhR exclusivamente en los progenitores neuronales y su progenie (Figura 70, B).

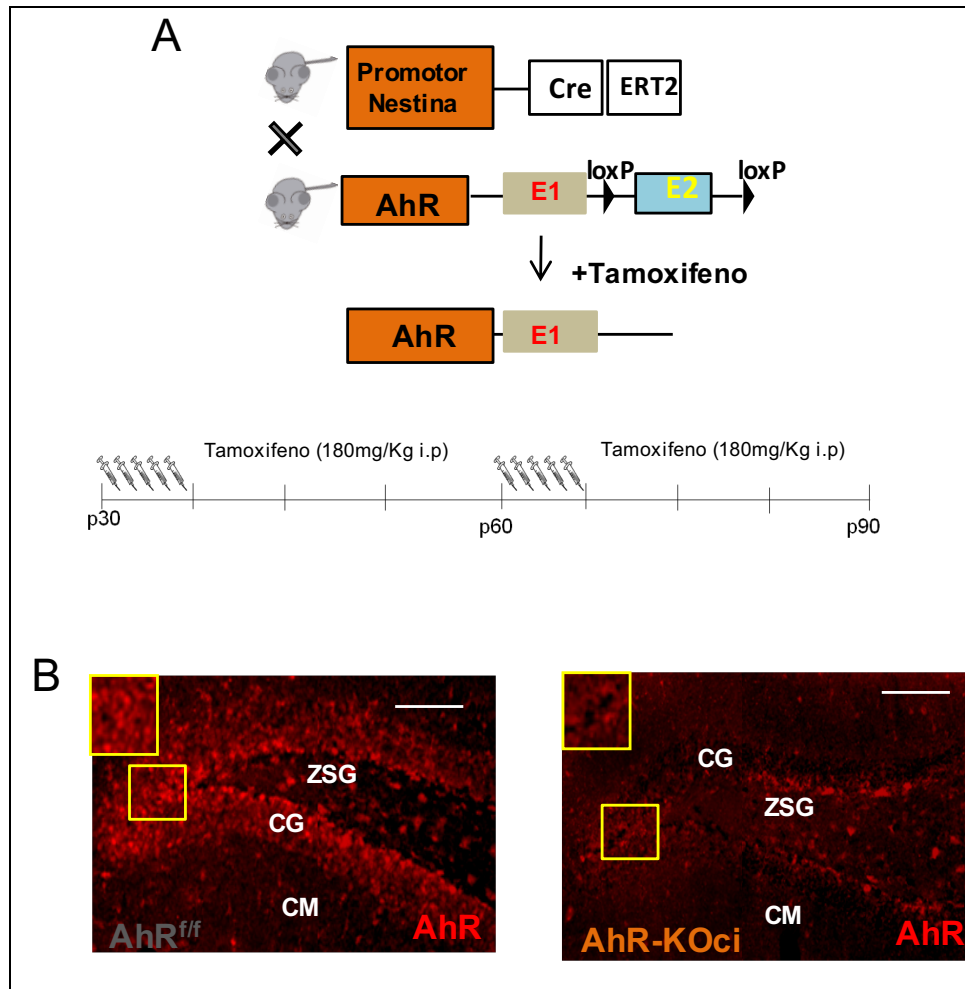


Figura 70. Generación de ratones *AhR-KOci*. (A) Arriba: el cruce de ratones que expresan la proteína Cre fusionada al receptor de estrógenos 2 (ERT2) bajo el promotor del gen nestina con los ratones que tienen flanqueado el exón 2 del gen de AhR por secuencias loxP, consigue generar ratones dobles transgénicos *AhR-KOci*. En estos animales, la presencia de tamoxifeno dará lugar a una proteína AhR no funcional específicamente en las células nestin⁺. Abajo: para inducir la recombinación, se les administró a los animales dos rondas de tratamiento con tamoxifeno (a p30 y p60) a una dosis de 180mg/Kg. (B) Imágenes representativas de la expresión de AhR antes (izquierda) y tras la administración de tamoxifeno (derecha) determinada mediante inmunofluorescencia. Zona subgranular: ZSG, capa granular: CG, capa molecular: CM. Escala = 50µm.

5.2.5.2 Alteraciones neurogénicas y morfológicas tras la delección específica de *AhR* en los progenitores neuronales

A 3 meses de edad y tras dos rondas de tratamiento con tamoxifeno, no se observaron diferencias en cuanto a los niveles de células proliferativas Ki67⁺ en los

animales AhR KOci respecto a sus controles (29.28 ± 2.93 vs. 33.47 ± 1.86 , AhR KOci vs. AhR^{ff}, n=6-8). Sin embargo, la delección específica de AhR produjo un aumento significativo en cuanto a los niveles de neuroblastos en la ZSG a los tiempos estudiados (**Figura 71, B**).

A continuación quisimos estudiar si la ausencia específica de AhR podría estar promoviendo cambios en la morfología de las nuevas neuronas granulares. Para ello se llevó cabo un análisis morfológico de las nuevas neuronas inmaduras (DCX⁺) en ausencia de AhR. La delección específica de AhR indujo un patrón tanto de arborización dendrítica (**Figura 71, D**) como de longitud dendrítica apical (**Figura 71, E**) similar al observado en los neuroblastos de los animales AhR^{-/-}, presentando así un mayor porcentaje del marcador DCX en la capa granular en comparación con la capa molecular (**Figura 71, F**). Estos resultados indican que la delección específica de AhR en los progenitores neuronales de la ZSG es suficiente para potenciar la neurogénesis y promover un fenotipo aberrante en las nuevas neuronas.

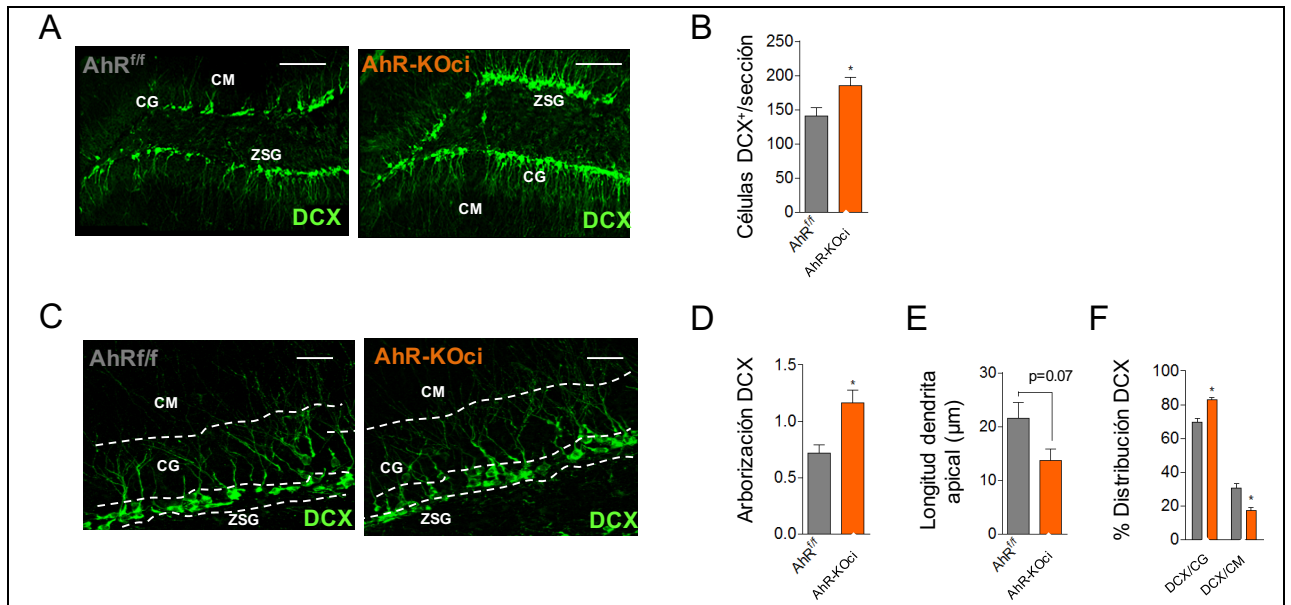


Figura 71. La delección específica de AhR en las nuevas neuronas granulares provoca cambios neurogénicos y una morfología aberrante. (A) Imágenes representativas de los neuroblastos en los animales AhR^{f/f} y AhR-KOci. (B) Cuantificación del número de células DCX⁺ en los animales AhR^{f/f} y AhR-KOci (*p<0.05 vs. AhR^{f/f}; (*p<0.05 vs. AhR^{+/-}; n=6-8 animales por grupo). (C) Imágenes representativas de la morfología de los neuroblastos en los animales AhR^{f/f} y AhR-KOci. (D) Arborización DCX en los animales AhR^{f/f} y AhR-KOci (*p<0.05 vs. AhR^{f/f}; n=6-8 animales por grupo). (E) Cuantificación de la longitud de la dendrita apical de los neuroblastos (p=0.07 vs. AhR^{f/f}; n=6-8 animales por grupo). (F) Porcentaje de la distribución de DCX en la capa granular (CG) y molecular (CM) (*p<0.05 vs. AhR^{f/f}; n=6-8 animales por grupo). Zona subgranular: ZSG, capa granular: CG, capa molecular: CM. Escala = 50μm. Estadística: (B y D-F) test t de Student no pareado seguido de un test de dos colas Mann-Whitney.

5.2.5.3 Alteraciones en la memoria dependiente de hipocampo tras la delección específica de AhR en los progenitores neuronales

Tras analizar las alteraciones tanto en la neurogénesis hipocampal como los cambios morfológicos que estaba produciendo la delección específica de AhR, decidimos estudiar si dichos cambios eran suficientes para provocar el desarrollo de alteraciones en la memoria. Para ello, los animales AhR KOci y AhR^{f/f} se sometieron al test del CMC y al laberinto en Y para analizar diferentes tipos de memoria dependiente de hipocampo.

Respecto al CMC, 24h tras el condicionamiento, los animales AhR KOci mostraron un menor porcentaje de congelación respecto al grupo control (Figura 72, A-B), indicando que la delección específica de AhR estaba provocando una alteración en la memoria de tipo contextual siguiendo el mismo patrón observado en los animales AhR^{-/-}.

Finalmente, 6h tras la sesión de entrenamiento en el test del laberinto en Y, los animales AhR^{ff} mostraron una preferencia hacia el brazo que había permanecido cerrado durante el entrenamiento, a diferencia de los AhR KOci los cuales mostraron un comportamiento totalmente aleatorio (Figura 72, C-D).

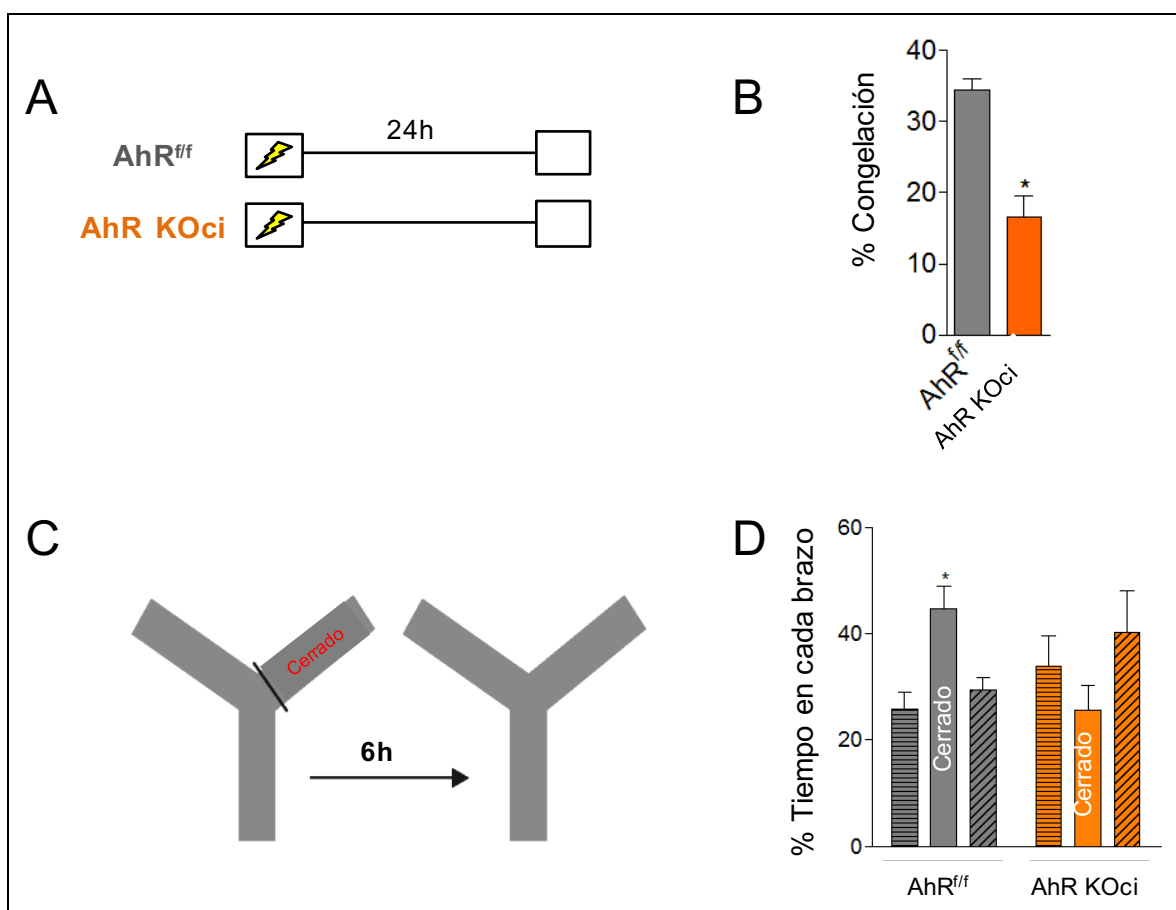


Figura 72. Alteraciones de la memoria contextual y espacial tras la delección específica de AhR. (A) Protocolo experimental para el panel (B). (B) Porcentaje de respuesta de congelación de los animales AhR^{ff} y AhR-KOci 24h tras el condicionamiento (0.48mAx1) (*p<0.05 vs. AhR^{ff}; n=6-8 animales por grupo). (C) Protocolo experimental para el panel (D). (D) Porcentaje de tiempo en cada brazo en el test del laberinto en Y 6h tras la fase de entrenamiento. Se identificó una interacción

significativa entre el tiempo en el brazo cerrado y el genotipo ($F_{(2, 57)}=5,91$; $*p<0.05$ vs. brazos abiertos; $n=6-8$ animales por grupo). Estadística: (B) test t de Student no pareado seguido de un test de dos colas Mann-Whitney; (D) ANOVA de dos vías no paramétrico seguido de un post-test de Bonferroni.

6

DISCUSSION PARTE I

6.1 EFECTO DE LA INHIBICION DE LA RESPUESTA NEUROGENICA HIPOCAMPAL EN EL DETERIORO COGNITIVO TRAS ISQUEMIA CEREBRAL EXPERIMENTAL

6.1.1 La isquemia cerebral experimental induce un deterioro cognitivo dependiente del hipocampo

En primer lugar, en nuestro modelo cortical de isquemia cerebral, hemos puesto de manifiesto una alteración de la memoria tanto de tipo contextual como espacial tras la isquemia permanente inducida por la oclusión de la arteria cerebral media en ratón. Este deterioro cognitivo únicamente lo detectábamos cuando la memoria era analizada a largo, pero no a corto plazo. Este resultado sugiere que, tras este tipo de daño cerebral agudo, se está produciendo un deterioro progresivo y persistente de las funciones cognitivas que se asemeja al que se observa en los pacientes de ictus (Brainin et al., 2015; Pendlebury and Rothwell, 2009; Tatemichi et al., 1994).

El riesgo de desarrollar deterioro cognitivo tras ictus ha sido asociado con el tamaño y la localización estratégica de la lesión inicial (Iadecola, 2013). Dado el bajo grado de variabilidad y a la precisa localización del daño en nuestro modelo de isquemia cerebral (exclusivamente cortical) pudimos predecir que otras estructuras subcorticales implicadas en los procesos de memoria y aprendizaje, pudieran estar viéndose afectadas de manera secundaria y de este modo estar contribuyendo al deterioro cognitivo.

En el cerebro adulto de los mamíferos, el hipocampo es una de las principales regiones implicadas en las funciones cognitivas. Esta estructura se encarga de la memoria de tipo episódica, relacionada con los sucesos autobiográficos que pueden evocarse explícitamente como, por ejemplo, momentos, lugares, emociones asociadas y conocimientos contextuales.

El hipocampo es una estructura que ocupa gran parte del eje rostro-caudal cerebral localizado ventralmente a la corteza cerebral, manteniendo así una estrecha interconexión con ella. Teniendo en cuenta su posición, hemos observado que el daño producido por nuestro modelo de isquemia cerebral no altera la anatomía macroscópica hipocampal ni produce atrofas secundarias a largo plazo. Sin embargo, igual que ocurre durante la fase de aguda del ictus en pacientes, durante las primeras 48-72 horas en nuestro modelo de isquemia se produce una fuerte respuesta neuroinflamatoria incluída dentro de lo que se conoce como cascada isquémica (Iadecola and Anrather, 2011), una secuencia de eventos consecutivos que llevan en último término a la lesión isquémica. En este escenario, se produce liberación de citoquinas proinflamatorias, activación de rutas de

excitotoxicidad que causan la muerte de neuronas como consecuencia de la liberación masiva de glutamato al espacio extracelular y el incremento en los niveles de Ca^{2+} intracelular, hiperactivación de la microglía y astrocitos, y llegada e infiltración de células del sistema inmune circulantes al parénquima cerebral, entre otros procesos que confluyen en potenciar el daño tisular. La mayoría de estos procesos tienen lugar en el denominado *core* isquémico y áreas circundantes (*peri-infarto*). Dada la proximidad del hipocampo del área dañada, no podemos descartar que alguno de estos mecanismos que se ponen en marcha durante las primeras fases del ictus pudiera estar igualmente afectando a la formación hipocampal. De hecho, la modulación de determinadas rutas inflamatorias (Rolls et al., 2007), así como los niveles de activación de la microglía (Sierra et al., 2010) y astrocitos (Song et al., 2002) son factores implicados en la regulación de la neurogénesis hipocampal adulta y, por tanto, en la memoria ante determinados contextos patológicos. De este modo, aunque en este trabajo no lo hemos explorado, sería interesante profundizar en futuros trabajos sobre estas posibles dianas que pudieran estar contribuyendo a las alteraciones cognitivas que hemos observado en esta tesis doctoral.

Aun así, y teniendo en cuenta todo lo anterior, hemos demostrado la participación del hipocampo en las alteraciones cognitivas tras ictus a través de diferentes aproximaciones. Primero, la inactivación temporal de la función hipocampal mediante la infusión con TTX bloqueó completamente la capacidad de recuerdo tanto en los animales sham como en los sometidos a isquemia indicando que, en nuestro modelo, la reactivación hipocampal es un factor crítico para la recuperación de la memoria. Segundo, la isquemia cerebral dificulta la correcta activación del

hipocampo en el proceso de recuperación de memorias almacenadas a largo plazo, tal como pone de manifiesto la reducción dramática en el número de células c-Fos⁺ en las distintas regiones de la formación hipocampal. Todas estas evidencias apuntan al hipocampo como la principal estructura cerebral implicada en el deterioro cognitivo en nuestro modelo de ictus.

6.1.2 La neurogénesis hipocampal inducida por la isquemia contribuye al deterioro cognitivo

A día de hoy, en el contexto del deterioro cognitivo de origen vascular, la comunidad científica está intentando caracterizar todos los posibles mecanismos que ponen en marcha la progresiva pérdida de las capacidades cognitivas de estos pacientes con el objetivo de poder frenar el desarrollo de esta patología. Desgraciadamente, son muchos los factores interconectados que participan en esta situación, lo cual dificulta la tarea de identificar alteraciones fisiopatológicas claves sobre las que poder actuar. Como anteriormente se comentaba, diferentes episodios cerebrovasculares tales como eventos tromboembólicos, microsangrados, hemorragias, la enfermedad de pequeño vaso y/o la hipoperfusión crónica confluyen en una reducción progresiva del LCR cerebral. En este escenario, se va a desencadenar una respuesta neuroinflamatoria que, unida a un estado hipóxico crónico y al estrés oxidativo, va a afectar al hipocampo, una de las principales estructuras cerebrales afectadas por estos procesos dada su alta sensibilidad a los cambios que se producen tanto en la vasculatura cerebral como en su microambiente (Venkat et al., 2015). En este contexto, y dada su estrecha relación con la mayoría de las funciones cognitivas, la alteración de alguno de los

factores de la propia fisiología hipocampal se postula como uno de los posibles responsables de la aparición y el desarrollo progresivo de las pérdidas de memoria observadas en el deterioro cognitivo de origen vascular.

En relación con la fisiología hipocampal, aparte de la generación de neuronas que se produce durante el desarrollo embrionario, en el sistema nervioso central adulto se encuentran nichos de células madre en dos regiones concretas: la zona subventricular (ZSV) y la zona subgranular (ZSG) del hipocampo. A través de lo que conocemos como [neurogénesis adulta](#), la mayor parte de estas células madre irán madurando progresivamente hasta convertirse en nuevas interneuronas en el bulbo olfatorio, y en neuronas granulares en el hipocampo, respectivamente (Zhao et al., 2008). El fenómeno de la neurogénesis es un proceso ampliamente estudiado en los roedores. En la actualidad, existe una controversia en la comunidad científica sobre la existencia de la neurogénesis hipocampal en el humano durante su etapa adulta (Sorrells et al., 2018). Hasta el momento, las dos únicas vías por las que se ha conseguido identificar las nuevas neuronas tanto en roedores como en humanos es a partir de incorporación de ^{14}C (Spalding et al., 2013), el análogo de la timidina, bromodeoxiuridina (Eriksson et al., 1998) y por tinciones histológicas con marcadores específicos. En multitud de ocasiones es difícil tanto modelizar como estudiar un proceso concreto debido a las propias diferencias especie-específicas. Desde los primeros trabajos que ponían de manifiesto la neurogénesis en la ZSG de humanos en los años 60, se han publicado diferentes estudios confirmando su existencia. La principal contradicción actual radica en que, aunque parece que la neurogénesis hipocampal en humano tiende a disminuir con la edad (como sucede en roedores), existe una falta de

consenso a la hora de trasladar los marcadores celulares específicos para identificar las nuevas neuronas inmaduras en la ZSG. Teniendo en cuenta las dificultades que entraña la investigación con cerebros humanos, la heterogeneidad de partida del tejido como consecuencia de la disparidad de formas de vidas de los individuos y estado de salud, así como el momento de la obtención y conservación de la muestra (factores clave en el mantenimiento de la integridad cerebral), resulta una tarea ardua el alcanzar un consenso a partir de estas últimas investigaciones (Boldrini et al., 2018; Sorrells et al., 2018). Por tanto, son necesarias más precisas investigaciones para llegar a un punto de encuentro entre toda la comunidad científica en relación a este asunto. Con todo ello, la importancia funcional atribuida históricamente a la neurogénesis hipocampal hace de este proceso un elemento muy relevante a la hora de entender la fisiología cerebral de los mamíferos en su fase adulta, como se ha demostrado en multitud de trabajos (Becker and Wojtowicz, 2007; Deng et al., 2010).

Aunque gran parte de la investigación en este campo se ha focalizado en estudiar la capacidad de la neurogénesis hipocampal adulta en los procesos de codificación, almacenamiento y recuperación de nueva información (Hasselmo et al., 1996; McNaughton and Morris, 1987; Treves and Rolls, 1994), se ha observado igualmente la implicación de la neurogénesis en diferentes contextos neuropatológicos tales como etapas tempranas de la enfermedad de Parkinson (EP), en enfermedad de Alzheimer (EA), en Huntington (EH), en episodios de depresión y ansiedad y en alteraciones cognitivas y/o olfativas, es decir, procesos atribuidos a la función olfativa e hipocampal en donde se encuentran los nichos neurogénicos del cerebro adulto (Hinnell et al., 2012; Simuni and Sethi, 2008; Stout

et al., 2011). En el caso de la EP, y teniendo en cuenta los diferentes modelos animales utilizados para su estudio, se han observado tanto incrementos (Winner et al., 2012) como disminuciones (Winner et al., 2004) en la producción de nuevas neuronas en el GD junto con una afectación en la morfología y conectividad de las nuevas neuronas integradas en el hipocampo (Winner et al 2012). En la EA, datos procedentes de los diferentes modelos transgénicos empleados para modelizar la enfermedad manifiestan una disminución en los niveles neurogénicos hipocampales que afectan, principalmente, a la fase proliferativa y, por otro lado, una integración aberrante de las nuevas neuronas (Rodríguez et al., 2008). En cuanto a la EH, diferentes estudios han demostrado igualmente una disminución en la proliferación de los progenitores hipocampales. Sin embargo, la morfología e integración de las nuevas neuronas no parece verse afectada (Fedele et al., 2011; Kohl et al., 2007), mientras que, en la ZSV, era la fase de integración la que únicamente se encontraba alterada (Kohl et al., 2010). En el caso que nos incumbe, diversos autores han demostrado que, en el contexto de la isquemia cerebral, la neurogénesis se encuentra igualmente alterada. Así, se ha observado que el daño isquémico cortical potencia la proliferación de los progenitores de la ZSV ipsilesional durante las primeras semanas del ictus promoviendo en paralelo una migración ectópica de estos progenitores, lo que les permite alcanzar no solo las regiones más dorsales del estriado sino también parte de la corteza dañada (Arvidsson et al., 2002; Moraga et al., 2014; Palma-Tortosa et al., 2017). Este proceso se ha considerado como un mecanismo neurorreparador endógeno del cerebro dañado mediante el cual se intenta repoblar parte de las neuronas perdidas por el ictus con nuevas neuronas procedentes de la ZSV, ya que se ha observado

que éstas son capaces de integrarse completamente en los circuitos corticales, favoreciendo incluso la recuperación, al menos parcial, de las funciones motoras alteradas en este contexto patológico. En la actualidad se cuestiona la capacidad real de supervivencia y, por tanto, la verdadera recuperación funcional tras el ictus por parte de las nuevas neuronas integradas en la corteza infartada (Kokaia et al., 2006). Sin embargo, se ha observado igualmente que la inhibición de la neurogénesis post-ictus no solo produce un incremento en el tamaño de la corteza cerebral infartada sino que exacerba los déficits motores asociados al ictus (Bravo-Ferrer et al., 2017; Jin et al., 2010; Wang et al., 2012). Por tanto, en términos generales, existe cierto consenso a la hora de reconocer la capacidad del estímulo neurogénico para reparar parte del daño cerebral, ya sea mediante la repoblación neuronal, mediante la liberación de factores neurotróficos pro-supervivencia (Thored et al., 2006; Zhang et al., 2004a) o promoviendo procesos angiogénicos en la zona de la penumbra isquémica (Ohab et al., 2006) donde, de hecho, se han identificado marcadores celulares típicos de neurogénesis en cerebros humanos *postmortem*, lo que sugiere una posible función neurorreparadora de la neurogénesis post-ictus igualmente en humanos (Jin et al., 2006).

Por otro lado, aunque menos explorada, la neurogénesis hipocampal parece igualmente verse afectada tras un episodio isquémico. En este contexto, se ha observado que la isquemia cerebral potencia la formación de nuevas neuronas granulares totalmente integradas en los circuitos hipocampales (Darsalia et al., 2005). En nuestro trabajo, hemos confirmado estos resultados. Así, en nuestro modelo de isquemia cerebral observamos esta potenciación neurogénica. Llevando a cabo un estudio longitudinal a largo plazo, hemos descrito un perfil temporal de la

respuesta neurogénica tanto en el hipocampo ipsi- como contralesional durante la fase crónica del ictus. En primer lugar, hemos observado un incremento tanto en el número de células con capacidad proliferativa (Ki67⁺) como en el de nuevas neuronas inmaduras (neuroblastos, DCX⁺), que presenta un pico dos semanas tras el daño isquémico, y que se mantiene elevado hasta un mes después del ictus. Esta respuesta neurogénica podría explicar el aumento observado en el volumen de la capa granular del giro dentado dado que, según nuestro estudio, finalmente la mayoría de los neuroblastos inducidos tras ictus acaban integrándose en los circuitos hipocampales.

De manera similar a lo que previamente se comentaba para la ZSV, esta potenciación neurogénica tradicionalmente se ha reconocido como un posible mecanismo neurorreparador endógeno, en este caso a nivel cognitivo, para paliar, al menos en parte, los déficits neurológicos que se desarrollan tras el ictus, dada la relación del hipocampo con la memoria. De hecho, algunos autores han demostrado cómo la potenciación de la proliferación, integración y supervivencia de las nuevas neuronas granulares tras ictus es capaz de mejorar la memoria de tipo espacial (Li et al., 2009). Igualmente, y reforzando esta idea, se ha observado que la ablación génica de los progenitores hipocampales tras ictus no solo supone una reducción en cuanto a la conectividad de la circuitería hipocampal entre las regiones de la CE y el GD, sino que la memoria de tipo espacial se ve empeorada (Sun et al., 2013), poniendo de manifiesto el papel beneficioso de la neurogénesis hipocampal tras ictus en la mejoría de la memoria, específicamente de tipo anterógrada. Sorprendentemente, nuestros resultados muestran cómo esta neurogénesis post-ictus estaría afectando negativamente a la capacidad de

recuerdo de todas aquellas memorias adquiridas previamente a la potenciación de la neurogénesis, es decir, a la memoria de tipo retrógrada. De hecho, hemos identificado que existe una correlación inversa entre los niveles neurogénicos y la capacidad de recuerdo tras isquemia, apoyando de este modo la idea de que la neurogénesis podría considerarse como un elemento modulador de la capacidad cognitiva que podría contribuir al deterioro cognitivo tras ictus isquémico.

En nuestro estudio, pudimos reforzar este nuevo concepto en cuanto al papel de la neurogénesis hipocampal post-ictus en la afectación de la memoria retrógrada ya que, utilizando diferentes estrategias pro-neurogénicas como son la actividad física (van Praag et al., 1999a; van Praag et al., 1999b) y el tratamiento farmacológico de memantina (Maekawa et al., 2009), produjimos un agravamiento del deterioro cognitivo tras ictus. Curiosamente, aunque dichas estrategias son ampliamente utilizadas en el ámbito experimental para favorecer la neurogénesis hipocampal, son igualmente terapias y tratamientos empleados en el campo del ictus para favorecer la recuperación de la función motora (Luo et al., 2007; Mang et al., 2013) y cognitiva (López-Valdés et al., 2014; Orgogozo et al., 2002; Trotman et al., 2015). El ejercicio físico no solo consigue mejorar notablemente la función motora de una gran cantidad de pacientes de ictus sino que también parece favorecer la capacidad cognitiva (Erickson et al., 2011). Por otro lado, el antagonista de los receptores NMDA, memantina, es un fármaco utilizado para frenar el deterioro cognitivo en pacientes con EA (Bleich et al., 2003), en casos de demencia moderada (Wilcock, 2003) y como fármaco neuroprotector frente a la excitotoxicidad inicial (Trotman et al., 2015) y las alteraciones de memoria que tienen lugar en la fase crónica en los pacientes de ictus (López-Valdés et al., 2014;

Trotman et al., 2015). Aunque no se conocen con exactitud los mecanismos por los cuales llevan a cabo su acción, diversos estudios apuntan que ambas terapias podrían incrementar los niveles del factor neurotrófico BDNF y su receptor TrkB en el hipocampo (Marvanová et al., 2001), potenciando de este modo la neurogénesis hipocampal y en consecuencia mejorando la función cognitiva.

Teniendo en cuenta todos estos antecedentes, podemos decir que nuestro estudio pone de manifiesto de manera novedosa la función hasta ahora desconocida de la neurogénesis hipocampal post-ictus en la memoria, concretamente en la memoria de tipo retrógrada. Como se comentaba, casi la totalidad de los estudios realizados en el campo de la reparación de la función cognitiva tras ictus mediada por procesos de neurogénesis se centran en el papel de las nuevas neuronas granulares en favorecer la capacidad de incorporar nueva información (memoria anterógrada) en los circuitos hipocampales de la memoria una vez producido el episodio isquémico. Sin embargo, apenas se ha explorado el rol deletéreo que juegan estas neuronas en las memorias adquiridas previamente a su formación y, por tanto, los mecanismos “patológicos cerebrales” que se ponen en marcha para explicar el deterioro cognitivo que hemos demostrado.

6.1.3 La isquemia cerebral induce una remodelación patológica de los circuitos hipocampales de la memoria

Como comentábamos anteriormente, las nuevas neuronas granulares integradas en el giro dentado podrían considerarse como nuevos sustratos a la hora de incorporar nueva información en los circuitos de la memoria. Sin embargo, como resultado de los fenómenos de integración y conectividad neuronal durante la neurogénesis, se produce en paralelo una remodelación de los circuitos hipocampales donde la memoria se encuentra almacenada previamente dificultando de este modo su accesibilidad, e impidiendo su recuerdo, fenómeno conocido como “olvido” (*forgetting*) (Akers et al., 2014). De este modo, nos planteamos si las nuevas neuronas inducidas tras el ictus pudieran estar produciendo un fenómeno de remodelación patológica diferencial explicando, al menos en parte, el debilitamiento de las memorias adquiridas previamente a la respuesta neurogénica tras el daño isquémico.

En condiciones fisiológicas, la mayoría de las células generadas en la ZSG acaban finalmente diferenciándose a neuronas granulares maduras. En primer lugar, estas neuronas comienzan desarrollando una dendrita apical primaria que se extiende a través de la capa granular hacia la capa molecular, en donde las prolongaciones dendríticas del árbol dendrítico se ramifican ampliamente. Durante este proceso, en las dendritas aparecen unas estructuras altamente especializadas tanto estructural como funcionalmente denominadas espinas dendríticas. A medida que las nuevas neuronas van adquiriendo sus características morfológicas, la maduración de las espinas dendríticas les permite progresivamente establecer las conexiones sinápticas apropiadas para su correcta integración en la circuitería

hipocampal. Por otro lado, estas neuronas desarrollan un axón (que da lugar a las denominadas fibras musgosas) que se extiende por la región hilar y acaba finalmente conectándose con las neuronas piramidales de la región CA3.

En nuestro modelo de isquemia cerebral, cuando analizamos la morfología de las nuevas neuronas granulares hemos observado unas alteraciones morfológicas a distintos niveles. En primer lugar, el análisis morfológico de las nuevas neuronas inmaduras con el marcador DCX reveló un impacto diferencial de la isquemia a nivel de los hipocampos ipsi- y contralesionales. Mientras que el componente dendrítico de los neuroblastos del hipocampo ipsilesional no pareció verse afectado por la isquemia, la arborización dendrítica de los neuroblastos del hipocampo contralesional se vió potenciada, viéndose altamente incrementada en la región más proximal de la capa molecular del GD. Dado que las nuevas neuronas son células altamente plásticas a lo largo de todo su proceso de maduración, realizamos la caracterización morfológica de las nuevas neuronas maduras mediante la infección retroviral con GFP, lo que nos permitió identificar los cambios definitivos que se estaban produciendo en los circuitos hipocampales tras ictus una vez integradas las nuevas neuronas generadas. Este análisis morfológico mostró de nuevo un impacto diferencial por parte de la isquemia en la morfología de las neuronas maduras. En primer lugar, curiosamente, la isquemia estaba afectando al crecimiento de la dendrita apical de las nuevas neuronas de forma diferente según el hemisferio afectado. Mientras que en el hipocampo ipsilesional, la longitud de la dendrita apical primaria mostraba un acortamiento, por el contrario, en el hipocampo contralesional presentaba una elongación. Por otro lado, otro parámetro que igualmente se vio afectado de manera diferencial por la isquemia

fue la complejidad del árbol dendrítico de las nuevas neuronas. Mientras que la isquemia potenció el crecimiento de la arborización dendrítica de las neuronas del hipocampo ipsilesional en la región más cercana al soma, en el hipocampo contralesional se observaba un mayor crecimiento en las distintas regiones de la capa molecular.

Otro de los elementos plásticos que son propensos a verse afectados ante diferentes contextos patológicos son las espinas dendríticas. El análisis de la densidad de espinas dendríticas reveló que la isquemia no estaba interfiriendo en la formación de espinas dendríticas en las nuevas neuronas de ambos hipocampos, a diferencia de otros modelos de isquemia en los que se ha visto la afectación en cuanto a la formación de espinas en las nuevas neuronas (Niv et al., 2012). De este modo, nuestros datos indican que, a pesar de los cambios morfológicos que la isquemia está produciendo de manera diferencial, la conectividad y, por tanto, la funcionalidad de las nuevas neuronas no parece verse comprometida, pudiendo considerarse así neuronas totalmente integradas y potencialmente moduladoras de los circuitos hipocampales.

En condiciones fisiológicas, las neuronas granulares conectan con los axones del TPM y TPL procedentes de la corteza entorrinal por medio de su componente dendrítico. Dependiendo de la longitud que alcance la dendrita apical primaria, variará el punto inicial de ramificación del árbol dendrítico, produciéndose por tanto cambios a nivel cuantitativo y cualitativo en la densidad de conexiones que se establecerán con las diferentes aferencias de la corteza entorrinal. Según el patrón morfológico diferencial que observamos, la isquemia parece estar

promoviendo conexiones preferenciales entre el componente dendrítico de las neuronas granulares y el TPM/TPL en los hipocampos ipsi- y contralesionales, respectivamente. De este modo, la remodelación patológica diferencial que se produce en los circuitos de la memoria como resultado de la integración de estas neuronas, podría estar alterando la conectividad fisiológica hipocampal y, por tanto, afectar a la función cognitiva de la que es responsable el hipocampo.

Previamente, en la literatura, se había descrito la afectación de la morfología de las nuevas neuronas tras isquemia (Niv et al., 2012). Además de identificar fenómenos de migración neuronal ectópica (por ejemplo, en la región hilar del GD), los autores destacaban la aparición tras isquemia de un nuevo tipo de neuronas de morfología bipolar, que se caracterizaban por la presencia de varias prolongaciones basales así como por un crecimiento excesivo del árbol dendrítico. En nuestro trabajo no hemos encontrado ni este fenotipo neuronal ni migración ectópica de las nuevas neuronas. Varias razones pueden explicar estas diferencias. En primer lugar, dicho estudio se ha realizado en rata, mientras que en nuestro trabajo hemos utilizado ratón, de modo que los parámetros morfológicos neuronales podrían variar entre especies. Además, llevan a cabo la infusión de las partículas virales durante la fase aguda del ictus. Esta fase se caracteriza por una fuerte respuesta neuroinflamatoria en donde la activación de la glía y la liberación de citoquinas tras el daño, entre otros, pueden participar en la modulación de la neurogénesis (Rolls et al., 2007; Sierra et al., 2010; Song et al., 2002). En nuestro caso, el marcaje de las nuevas neuronas tras ictus lo llevamos a cabo después de la fase aguda del ictus (14 días tras la cirugía), en un “escenario” mucho menos proinflamatorio. De este modo los factores post-ictus que pudieran afectar al desarrollo morfológico de

las nuevas neuronas son radicalmente distintos, pudiendo explicar así las diferencias anatómicas identificadas en nuestros resultados. Por último, dichos autores (Niv et al., 2012; Woitke et al., 2017) no analizan la presencia de un remodelado diferencial de las nuevas neuronas a nivel de los hipocampos ipsi- y contralesionales. Así, en la presente tesis doctoral, se describe por primera vez la existencia de un remodelado diferencial de los circuitos hipocampales tras ictus. En conjunto, nuestros datos apuntan a que el daño producido por la isquemia cerebral genera un ambiente patológico capaz de modificar el desarrollo dendrítico de las nuevas neuronas granulares.

Por otro lado, nuestros datos también muestran que el ictus promueve una remodelación diferencial en el otro componente de la conectividad de las neuronas granulares como son las conexiones entre el giro dentado y CA3. Diferentes modelos computacionales estiman que cada una de las nuevas neuronas granulares producidas durante la neurogénesis adulta es capaz de establecer sinapsis con hasta 11-15 neuronas piramidales diferentes de la región de CA3 (Acsády et al., 1998; Toni et al., 2008; Zhao et al., 2008). En nuestro modelo de isquemia cerebral, hemos observado en la región de CA3 un patrón de hipo- e hiperintegración de las fibras musgosas de los neuroblastos en los hipocampos ipsi- y contralesional, respectivamente. Estos datos podrían indicar que la isquemia potencia una mayor conectividad sináptica entre las regiones del giro dentado y CA3 del hipocampo contralesional en comparación con el ipsilesional. Aunque no hemos confirmado este resultado en nuevas neuronas totalmente integradas y maduras, se ha descrito que los neuroblastos (entre 2-6 semanas de edad) poseen una alta capacidad de plasticidad sináptica (Ge et al., 2008; Ge et al., 2007;

Schmidt-Hieber et al., 2004), lo que subraya la importancia de estas células en cuanto a la remodelación de las sinapsis existentes. Por tanto, a nivel axonal, y de acuerdo con los análisis morfológicos del componente dendrítico, en la región de CA3 la isquemia parece estar promoviendo igualmente un patrón de hipo- e hiperremodelado de los circuitos en los hipocampos ipsi- y contralesional, respectivamente.

En conjunto, todos estos cambios morfológicos que hemos observado manifiestan que la isquemia está provocando alteraciones diferenciales en la maduración e integración de las nuevas neuronas granulares en las regiones del giro dentado y CA3. Dado que para la recuperación de las memorias almacenadas en los circuitos hipocampales es necesaria la reactivación específica de las diferentes conexiones neuronales que codificaron dicha información en el momento del aprendizaje (*engram*) (Josselyn, 2010), el resultado de esta reorganización patológica de los circuitos hipocampales podría ser suficiente para impedir el acceso y recuperación de las memorias previamente almacenadas al momento de la integración de estas neuronas, favoreciéndose, por tanto, su olvido. Todos estos datos sugieren, que el remodelado bilateral y diferencial que se está produciendo en los circuitos hipocampales tras ictus podría ser responsable del deterioro cognitivo observado en nuestro modelo.

6.1.4 La inhibición de la respuesta neurogénica tras la isquemia cerebral impide el deterioro cognitivo

Hasta ahora, nuestros resultados sugieren que el aumento de neurogénesis que se produce después de la isquemia, conduce a una remodelación patológica de los

circuitos hipocampales, posiblemente por entorno alterado a nivel neuroquímico y/o neuroinflamatorio. Así, el alto número de neuronas generadas, que originalmente es similar a nivel ipsi- como contralesional, se integran anormalmente en uno y otro hipocampo, adquiriendo una morfología aberrante. Por ello, pensamos que la inhibición de la respuesta neurogénica podría prevenir este proceso.

Para confirmar nuestra predicción, llevamos a cabo una inhibición de la respuesta neurogénica mediante diferentes aproximaciones tanto farmacológicas (tratamiento con temozolomida) como génicas (ratones NestinaCre^{ERT2}-NSE/ATD). Dada su capacidad de bloquear el proceso de proliferación celular, el tratamiento con temozolomida consiguió reducir la respuesta neurogénica tras ictus. En cuanto a las estrategias génicas, nos basamos en que, en el caso de la neurogénesis hipocampal, uno de los marcadores que adquieren las células una vez establecido el linaje neuronal es la *enolasa específica de neuronas (NSE)* (Kaiser et al., 1989; MOORE and MCGREGOR, 1965). La inducción específica de la expresión del fragmento A de la toxina de la difteria (ATD) en las nuevas neuronas granulares hipocampales nos permitió abolir genéticamente la respuesta neurogénica tras ictus, ya que las nuevas neuronas, al expresar NSE y, por tanto, ATD, entran en apoptosis. A diferencia de otros modelos genéticos en los que la eliminación de las neuronas promueve una respuesta neuroinflamatoria (por ejemplo, en los ratones timidina quinasa (Singer et al., 2009)), en nuestro trabajo conseguimos reducir la respuesta neurogénica sin alterar el microambiente del hipocampo, evitando de este modo comprometer la función hipocampal y por tanto los procesos de memoria y aprendizaje.

Así, mediante ambas estrategias, conseguimos abolir de manera bilateral la respuesta neurogénica inducida durante la fase crónica de la isquemia, recuperando una tasa neurogénica similar a la de los niveles basales observados en los ratones control tanto a nivel de células proliferativas como de neuroblastos.

De acuerdo con nuestra hipótesis, la restauración de los niveles neurógenicos hipocampales tras el tratamiento con temozolomida o mediante la eliminación génica de las nuevas neuronas tras ictus impidió el desarrollo del deterioro cognitivo dependiente de hipocampo observado en los animales isquémicos, específicamente a nivel de las memorias de tipo contextual y espacial.

Acorde con nuestros resultados de remodelado, al impedir la formación de un alto número de nuevas neuronas tras la respuesta neurogénica elevada tras ictus estaríamos evitando su integración y la remodelación aberrante de los circuitos hipocampales en el entorno patológico de la isquemia. De este modo, conseguiríamos reducir los fenómenos tanto de hipo- como de hiperremodelación de los circuitos hipocampales en los hemisferios ipsi- y contralesionales, respectivamente, conservando así la integridad de las conexiones sinápticas en donde la memoria se encuentra almacenada y, por tanto, el mantenimiento del acceso a los recuerdos. Quedan por estudiar cuáles son los mecanismos responsables de la hipo- e hiperintegración de las nuevas neuronas granulares después de la isquemia. Como comentábamos anteriormente, una vez pasada la fase aguda del ictus se da paso a la fase crónica, caracterizada por un contexto mucho más resolutivo (Iadecola and Anrather, 2011). En este escenario cambiante, el tejido cerebral pasa de un contexto exitotóxico junto con altos niveles de

citoquinas proinflamatorias, microgliosis, astrocitosis, muerte neuronal, entre otros, a un ambiente reparador caracterizado por favorecer procesos de crecimiento axonal, gliogénesis, angiogénesis, plasticidad sináptica y también neurogénesis (Darsalia et al., 2005; Ergul et al., 2012; Li et al., 2010a; Li et al., 2010b; Murphy and Corbett, 2009). En cuanto a la neurogénesis, es un proceso secuencial en el que las nuevas neuronas van paulatinamente creciendo y madurando hasta que finalmente se integran en los circuitos sinápticos. Dado que a lo largo de este proceso las nuevas neuronas son altamente plásticas, es decir, sensibles a los cambios que se den en el microambiente en el que se están desarrollando (Seki, 2003), es muy probable que dada la proximidad de la región infartada a la ZSG hipocampal, muchos de los cambios que se citaban anteriormente estén afectando diferencialmente a los procesos de maduración e integración de las nuevas neuronas generadas. De hecho, diversos estudios han descrito cómo cambios en el microambiente proinflamatorio cerebral afectan a las distintas fases de la neurogénesis y a la memoria dependiente del hipocampo (Belarbi et al., 2012; Belarbi and Rosi, 2013; Enciu and Popescu, 2013). Además, dado que la ZSG ipsi- y contralesional se encuentran a una distancia diferente respecto a la región isquémica, probablemente se esté dando un gradiente en el impacto de todos estos cambios temporales sobre la maduración e integración de las nuevas neuronas de cada hipocampo, pudiéndose así explicar, al menos en parte, el remodelado diferencial que hemos identificado en esta tesis doctoral. De este modo, sería interesante profundizar en futuros trabajos sobre la caracterización longitudinal de los posibles cambios que se producen en el microambiente de ambos nichos neurogénicos que pudieran ser potenciales dianas en la regulación de la morfología

diferencial de las nuevas neuronas granulares tras ictus y, por tanto, en el deterioro cognitivo asociado.

Como inicialmente comentábamos, el deterioro cognitivo es una de las mayores secuelas que se da durante la fase crónica del ictus. En torno al 80% de los pacientes acaba desarrollando algún tipo de trastorno cognitivo a los 3 meses de sufrir un ictus (Jokinen et al., 2015). Sin embargo, en relación a los mecanismos fisiopatológicos inductores de estas alteraciones así como la falta de diagnóstico, existen muchos interrogantes todavía sin resolver. Actualmente, dada la disparidad entre pacientes en cuanto a su estado de salud mental inicial así como las diferencias en el daño inicial producido por el ictus, no se tiene todavía establecido qué regiones cerebrales podrían estar participando en este deterioro cognitivo. Varios trabajos han intentado llevar a cabo esta caracterización utilizando la escala neurológica denominada *Clinical Dementia Rating (CDR)* (Hughes et al., 1982). Esta escala es ampliamente utilizada para identificar las regiones cerebrales afectadas en los pacientes con demencia producida por la enfermedad de Alzheimer; sin embargo, no permite hacer un mapeo tan específico de la afectación conjunta de varias zonas cerebrales en el contexto del ictus. Otro de los tests que se ha empleado para el estudio de la función cognitiva es el denominado Mini Examen del Estado Mental (*Mini-mental state examination, MMSE*) (Tombaugh and McIntyre, 1992). Esta prueba es un método empleado para detectar, vigilar y evaluar el deterioro cognitivo con alteraciones neurológicas. Sin embargo, en el caso del ictus, la aparición de fenómenos tales como depresión, infecciones, hemorragias subaracnoideas, típicos en estos pacientes, son considerados como criterios de exclusión que limitan la validez y, por tanto, la potencia de este test.

Todo ello, unido a los escasos estudios de neuroimagen, pone de manifiesto la necesidad de identificar nuevos marcadores y pruebas neuropsicológicas para la evaluación de la función cognitiva en la fase crónica del ictus.

Otra línea importante a valorar atañe a los modelos animales para estudiar el deterioro cognitivo post-ictus. Nuestro modelo de isquemia cerebral (MCAO) es uno de los mejores modelos empleados en el estudio del ictus ya que “representa” a la gran mayoría de los ictus, que son los de tipo isquémico. En este trabajo hemos conseguido reproducir, al menos en parte, el desarrollo del deterioro cognitivo observado en los pacientes durante la fase crónica del ictus. Igualmente, cabe destacar que hemos demostrado que el remodelado bilateral y diferencial de los circuitos hipocampales tras la respuesta neurogénica, podría considerarse como uno de los principales inductores de las alteraciones de memoria ya que, mediante el bloqueo del aumento de neurogénesis tras ictus, hemos conseguido mantener intacta la capacidad cognitiva de los animales. Por todo ello, los mecanismos fisiopatológicos que hemos descrito en la presente tesis doctoral podrían considerarse como una potencial, novedosa y casi única diana terapéutica propuesta hasta el momento sobre la que profundizar para el desarrollo de futuros tratamientos en la demencia post-ictus.

6

DISCUSSION PARTE II

6.2 PAPEL DEL RECEPTOR DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS (AHR) EN LA MORFOLOGÍA DE LAS NUEVAS NEURONAS GRANULARES Y LA MEMORIA DEPENDIENTE DEL HIPOCAMPO

6.2.1 Memoria específica del hipocampo: papel de AhR

AhR (*Aryl hydrocarbon Receptor*) es un factor de transcripción activado por ligando, perteneciente a la superfamilia hélice-bucle-hélice-PER-ARNT-SIM (bHLH-PAS), históricamente implicado en mediar los efectos tóxicos y carcinógenos de los compuestos xenobióticos. En los últimos años se ha visto que la expresión de este receptor no se limita al sistema inmune, como tradicionalmente se creía, sino que también se encuentra ampliamente expresado en el sistema nervioso central. En este contexto, está comenzándose a comprender su papel tanto fisiológico como patológico.

Recientemente se ha detectado la expresión del ARNm de AhR en las células granulares del giro dentado del hipocampo adulto (Kimura and Tohyama, 2017), estructura cerebral clave en los procesos de memoria y aprendizaje, y que se encuentra a menudo alterada ante determinados trastornos neurológicos. AhR es el único miembro conocido de la familia bHLH-PAS capaz de ser activado por ligandos endógenos y exógenos (Boitano et al., 2010; Cuartero et al., 2014; Mandal, 2005; Mimura and Fujii-Kuriyama, 2003; Mimura et al., 1997; Nguyen and Bradfield, 2008). De este modo, el potencial terapéutico derivado de este hecho nos llevó a estudiar el papel de AhR en la función hipocampal.

Antes comentábamos la importancia del hipocampo en las funciones cognitivas en el adulto. Como decíamos, se encarga de la memoria episódica, que incluye, entre otras, las memorias de tipo contextual y espacial. En nuestro estudio sometimos a ratones WT o que presentaban deleccionado el exón 3 del gen AhR a diferentes baterías de tests con el fin de identificar la contribución de AhR en cada una de estas memorias. Nuestros datos demuestran que la ausencia de AhR afecta a diferentes tipos de memorias específicas del hipocampo como son las de tipo contextual (CMC y RON) y las de tipo espacial (NLO, laberinto en Y y laberinto de Barnes).

Dada la gran variedad de moléculas, tanto endógenas como exógenas, que potencialmente se comportan como ligandos del receptor AhR, y teniendo las distintas rutas de señalización que éste puede poner en marcha dependiendo de su grado de activación, nuestros resultados ponen de manifiesto la importante contribución a nivel cognitivo que podría estar llevando a cabo AhR en condiciones fisiológicas y patológicas. En este escenario, nuestro trabajo indica un papel fisiológico de AhR en procesos de memoria, lo que supondría que una activación

mediante ligandos exógenos podría alterar sus funciones canónicas como hemos comprobado en los animales KO para AhR. Por ejemplo, en los últimos años se ha demostrado cómo muchos de los metabolitos derivados de la dieta y productos de la microbiota intestinal son capaces de modular la función cerebral, lo que sugiere que pudieran ser responsables del desarrollo de diferentes tipos de estrés, cambios de humor (Kelly et al., 2015) e incluso en el agravamiento de patologías tales como el ictus (Wen and Wong, 2017). Dado que alguna de estas moléculas es capaz de activar a AhR, a partir de nuestro estudio, podría considerarse potencialmente este eje de señalización como una vía endógena de modulación de los procesos cognitivos. Por otro lado, en la sociedad actual existe una gran cantidad de emisiones a la atmósfera de productos de origen industrial que afectan gravemente a la salud, principalmente a nivel respiratorio y vascular. En este contexto, es importante señalar que el receptor AhR es potencialmente activable por muchos de estos compuestos. De hecho, varios estudios han demostrado la participación de este receptor en los efectos tóxicos y carcinógenos específicamente de los compuestos derivados de los xenobióticos (Fernandez-Salguero et al., 1995; Fernandez-Salguero et al., 1996; Mandal, 2005; Murray et al., 2014). En relación a esto, en la literatura se pone de manifiesto el potencial efecto deletéreo sobre determinados tipos de memoria que tiene la activación de AhR tras su activación por la dioxina (Pazderova-Vejlupková et al., 1981; Powers et al., 2005; Zober et al., 1994).

En conjunto, dada la alta “promiscuidad” de AhR para activarse por ligandos endógenos y exógenos, y teniendo en cuenta su participación en la regulación de los procesos cognitivos, la profundización en las diferentes vías de señalización puestas en marcha tras la activación por parte de los diferentes ligandos y su

impacto sobre la memoria, permitiría conocer potenciales dianas sobre las que actuar para regular la función cognitiva ante determinados contextos patológicos.

6.2.2 Neurogénesis hipocampal: papel de AhR

Como ya comentamos en la sección anterior, abundantes datos en la literatura demuestran que las nuevas neuronas granulares generadas durante la neurogénesis hipocampal adulta se encuentran implicadas tanto en la adquisición como en el recuerdo de memorias dependientes de la formación hipocampal (Aimone et al., 2014; Anacker and Hen, 2017). De este modo, la neurogénesis hipocampal adulta es considerada como un elemento fundamental en los procesos cognitivos (Kempermann et al., 1997; van Praag et al., 1999b; van Praag et al., 2002; Zhao et al., 2006).

La reducción de la neurogénesis hipocampal, en paralelo con las alteraciones de memoria que han sido previamente descritas en animales deficientes para AhR de 12 semanas de edad (Latchney et al., 2013), podría por tanto explicar los déficits en la memoria de tipo contextual y espacial dependientes de hipocampo que hemos observado en los animales AhR^{-/-} de 2 meses de edad (p60). Sin embargo, por el contrario, lo que hemos observado es que, a esta edad, estos animales presentan una potenciación de la neurogénesis hipocampal, como se observa en el número de células con capacidad proliferativa, de neuroblastos y de nuevas neuronas integradas. Por tanto, con estos datos, podemos descartar que los déficits de memoria se deban a una disminución de la neurogénesis.

Por el contrario, lo que hemos encontrado es que, tanto a p30 como a p60, la ausencia de AhR promueve un incremento de la proliferación de las células

progenitoras neurales (NPCs). Además, hemos observado que, a p100, este comportamiento se invierte, lo que se manifiesta en una reducción en la proliferación de las NPCs, similar a lo que previamente estaba descrito a 12 semanas de edad (Latchney et al., 2013). Una posible explicación a estos resultados es que la alta tasa neurogénica desde etapas tempranas en ausencia de AhR provoque una extenuación del nicho neurogénico, perdiéndose progresivamente tanto el *pool* de células troncales totales de tipo I y II en estado de reposo como en estado proliferativo. De hecho, el papel de AhR como regulador de la proliferación de las células troncales podría considerarse como una función conservada en otros tejidos, ya que se ha descrito que su ausencia provoca la extenuación de varios tipos celulares en los nichos hematopoyéticos como consecuencia de aumentar la tasa proliferativa de estas células (Singh et al., 2014; Smith et al., 2013).

En cualquier caso, tal como se comentaba anteriormente, podemos descartar que los déficits de memoria dependientes de hipocampo que observamos a 2 meses en ausencia de AhR se deben a una disminución de la tasa neurogénica, lo que sugiere que deben existir otros mecanismos que expliquen estas alteraciones.

6.2.3 Morfología de las neuronas granulares: papel de AhR

AhR es una proteína altamente conservada estructuralmente desde los invertebrados hasta los mamíferos. Aunque en mamíferos se ha descrito que su papel principal es la participación en los efectos tóxicos del metabolismo de compuestos xenobióticos como la dioxina (Barouki et al., 2007; Fernandez-

Salguero et al., 1996; Fernandez-Salguero et al., 1997; Fujii-Kuriyama and Mimura, 2005), en los invertebrados, los ortólogos de AhR no responden e incluso carecen de capacidad de unirse a estos compuestos, sugiriendo de este modo otra función de AhR conservada en la filogenia. De hecho, estudios previos en *Caenorhabditis elegans* (Huang et al., 2004; Qin and Powell-Coffman, 2004; Smith et al., 2013) y en *Drosophila melanogaster* (Crews and Brenman, 2006; Kim et al., 2006) han identificado a los ortólogos de AhR como importantes reguladores de la arborización dendrítica en diferentes tipos neuronales. Recientemente, en mamíferos, se ha descrito cómo la activación constitutiva de AhR modifica tanto la migración como el desarrollo del árbol dendrítico de las nuevas interneuronas del bulbo olfatorio y de las neuronas hipocampales de la región de CA1, respectivamente, en el cerebro de ratón (Kimura et al., 2016; Kimura et al., 2017). Sin embargo, la función específica de AhR en la arborización dendrítica y en la integración de las neuronas granulares del giro dentado en el cerebro adulto de ratón era desconocida.

Nuestros estudios, utilizando tanto la tinción histológica de Golgi-Cox como la tinción inmunológica de DCX, mostraron un patrón de arborización dendrítica alterada en ausencia de AhR, tanto en neuronas granulares maduras como inmaduras. Por otro lado, el marcaje de las nuevas neuronas granulares generadas durante la neurogénesis hipocampal adulta mediante la infección con el retrovirus GFP nos permitió confirmar que la ausencia de AhR altera la morfología neuronal. Estos datos explican, al menos en parte, los déficits de memoria en estos animales: las nuevas neuronas AhR^{-/-} mostraron una morfología alterada caracterizada por un acortamiento de la dendrita apical primaria junto con un alto grado de arborización del árbol dendrítico en la región más próxima al soma neuronal. Dado que no

hemos observado fenómenos de migración ectópica, el acortamiento de la dendrita apical no parece deberse a procesos de migración aberrante en la capa granular durante la maduración de las nuevas neuronas granulares. Teniendo en cuenta que la correcta maduración de las dendritas es fundamental para el correcto establecimiento de las conexiones sinápticas, esta morfología aberrante podría estar interfiriendo en la conectividad sináptica de las neuronas granulares y, por tanto, en el funcionamiento hipocampal, lo que podría explicar las alteraciones de memoria dependientes de hipocampo observadas en ausencia de AhR.

En cuanto a la morfología de las espinas dendríticas, mientras que las espinas de tipo “filopodio” y “sin cuello” están tradicionalmente asociadas con neuronas y sinapsis inmaduras, las de tipo “delgadas” y “fungiforme” son más abundantes en las neuronas maduras (Carlisle and Kennedy, 2005; Spruston and Johnston, 2008; Zhao et al., 2006). El marcaje con el retrovirus GFP nos permitió detectar que las neuronas granulares AhR^{-/-} presentan una mayor densidad de espinas dendríticas pero, sin embargo, una marcada disminución en cuanto al número de espinas tipo “fungiforme”. De este modo, tanto el desequilibrio en cuanto a la densidad total de espinas como el número de espinas tipo “fungiforme” podría estar alterando las propiedades electrofisiológicas de las neuronas granulares (Spruston and Johnston, 2008), lo que afectaría su actividad sináptica y, finalmente, su función.

6.2.4 Propiedades sinápticas de las neuronas granulares y los circuitos hipocampales: papel de AhR

Los estudios morfológicos que llevamos a cabo ponen de manifiesto que la ausencia de AhR induce una alteración en la conectividad de las neuronas

granulares y, por tanto, de los circuitos hipocampales. Dado que el hipocampo controla los procesos de memoria y aprendizaje, la distorsión de la circuitería hipocampal como consecuencia de la integración de las nuevas neuronas granulares aberrantes en el giro dentado en ausencia de AhR podría explicar, al menos en parte, el desarrollo de alteraciones cognitivas.

Diversos estudios *ex vivo* han demostrado que tanto los cambios morfológicos como las propiedades sinápticas que van adquiriendo las nuevas neuronas granulares durante su maduración les confieren ciertas propiedades transitorias en el funcionamiento general de los circuitos hipocampales. Estas investigaciones han puesto de manifiesto que las neuronas nuevas, todavía inmaduras, son capaces de integrarse completamente en los circuitos, manifestando una mayor excitabilidad intrínseca junto con una menor inhibición sináptica que las neuronas maduras, pudiendo responder así incluso a nuevos estímulos de muy baja intensidad (Marín-Burgin and Schinder, 2012; Mongiat et al., 2009). Partiendo de estas características, las nuevas neuronas inmaduras se consideran la principal población neuronal con capacidad de responder ante la llegada de nueva información al hipocampo. Es por ello por lo que la incorporación e integración de este fenotipo neuronal provocaría una distorsión del funcionamiento de los circuitos hipocampales (Aimone et al., 2009).

Los cambios morfológicos que presentan las nuevas neuronas granulares en ausencia de AhR podrían estar interfiriendo en las propiedades fisiológicas hipocampales. Para comprobar este punto, llevamos a cabo estudios electrofisiológicos en rebanadas de hipocampo. De acuerdo con nuestra hipótesis, los registros electrofisiológicos sobre las neuronas granulares mostraron que la ausencia de AhR se asocia a un incremento de su excitabilidad intrínseca. Tal

como comentábamos previamente, las propiedades electrofisiológicas de las neuronas se modifican durante el proceso de maduración. Así, el cambio en cuanto a la composición de receptores postsinápticos así como en los umbrales de despolarización hace que las nuevas neuronas granulares sean progresivamente más restrictivas a la hora de “lanzar” un potencial de acción y, por tanto, de responder a un estímulo (Deng et al., 2010). En este contexto, los resultados obtenidos en el presente estudio ponen de manifiesto que la ausencia del receptor AhR afecta a las propiedades electrofisiológicas de las neuronas granulares, que aparentemente presentan un fenotipo de neurona más inmadura (Dieni et al., 2016; Lopez-Rojas and Kreutz, 2016), semejante al que presentan las nuevas neuronas generadas mediante la neurogénesis. Estas propiedades podrían tener importantes repercusiones a nivel de la función cognitiva dado que a mayor excitabilidad, las neuronas son capaces de responder con una mayor facilidad e incluso a estímulos de menor intensidad. Esto podría provocar que, ante esta mayor facilidad de respuesta, las neuronas que carecen de AhR pudieran estar saturando la circulación de la información por los circuitos hipocampales de la memoria, dificultándose así los procesos de codificación y almacenamiento de la nueva información (Celone et al., 2006; Dickerson et al., 2004; Hämäläinen et al., 2007). Para entender la contribución específica de AhR, sería necesario profundizar en el posible papel que este receptor pudiera estar llevando a cabo en condiciones fisiológicas a nivel del compartimento sináptico. De hecho, aunque la mayor parte de las funciones de AhR se ha relacionado con su papel a nivel de citoplasma y su función como factor de transcripción, varios estudios han demostrado la presencia de AhR a nivel de membrana plasmática (Rey-Barroso et al., 2014) y no solo eso, sino también que, además, la modulación de los niveles de actividad, AhR podría

estar regulando la expresión de diferentes subunidades de los receptores NMDA, así como de la actividad de los mismos (Lin et al., 2009).

Otro de los procesos que tienen lugar durante la maduración de las nuevas neuronas granulares es la formación, establecimiento y activación de las sinapsis. Estos procesos siguen un curso temporal desde el inicio de la maduración neuronal: a partir de los 21 días desde su generación, las nuevas neuronas inmaduras comienzan a incrementar tanto la densidad como la funcionalidad de las espinas dendríticas. No es hasta los 28 días cuando se consideran completamente maduras y funcionales (Zhao et al., 2006). Estos cambios resultan fundamentales para los procesos de memoria y aprendizaje. Durante este proceso, los receptores postsinápticos en las espinas dendríticas pasan de estar preferencialmente constituidos por los de tipo NMDA a incorporar receptores tipo AMPA (α -amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxazol-propionato) (Carlisle and Kennedy, 2005; Chater and Goda, 2014; Paoletti et al., 2013; Tada and Sheng, 2006), lo que facilita los procesos de despolarización y, por tanto, la transmisión de señales por el circuito.

Nuestros resultados sugieren que AhR podría ser necesario para estos cambios electrofisiológicos: hemos encontrado una reducción en cuanto a la proporción de receptores AMPA/NMDA en las neuronas granulares AhR^{-/-}, que probablemente indica una disminución en cuanto a las respuestas sinápticas en las que se encuentran directamente implicados los receptores AMPA.

Como previamente comentábamos, durante la maduración fisiológica de las neuronas granulares se produce un incremento del número de espinas dendríticas maduras como consecuencia de la progresiva incorporación de receptores tipo AMPA en las sinapsis (Bassani et al., 2013). Nuestros estudios morfológicos

demuestran que la deficiencia de AhR se asocia a una mayor proporción de espinas dendríticas inmaduras en las neuronas granulares maduras. Por tanto, nuestros resultados apoyan la idea de que AhR es necesario para este proceso de maduración, muy probablemente a través de una modulación de los niveles de receptores AMPA y NMDA en las espinas dendríticas.

Por último, para explorar si la capacidad de integración de información en el giro dentado procedente de la corteza entorrinal se encontraba alterada, estudiamos la relación de pares de pulsos (PPR) como una medida de la función hipocampal. La PPR fue significativamente mayor en las rodajas hipocampales de los animales AhR^{-/-} que en las de los AhR^{+/+}. Estos datos sugieren que el fenotipo inmaduro de las espinas dendríticas en ausencia de AhR está afectando a la sinapsis en sentido retrógrado, alterando de este modo la liberación de neurotransmisor por parte de los terminales axónicos del tracto perforante procedente de la corteza entorrinal.

6.2.5 Morfología de las nuevas neuronas y la memoria dependiente de hipocampo: papel de AhR en los progenitores neuronales

Todas las alteraciones observadas hasta ahora se han descrito mediante el empleo de animales deficientes en AhR de manera constitutiva. Diversos estudios han demostrado que la ausencia del receptor AhR provoca en los animales múltiples defectos relacionados con alteraciones cardíacas y vasculares (Carreira et al., 2015), fenómenos de hipersensibilidad inmunológica (Sekine et al., 2009), alteraciones cutáneas (Li et al., 2011), y también en el sistema nervioso central con alteraciones en el sistema visual y en la mielinización (Juricek et al., 2017). Por

tanto, nuestros resultados podrían ser simplemente un epifenómeno, al menos en parte, debido a todos estos defectos a nivel sistémico.

De este modo, para profundizar en la función de AhR específicamente en las nuevas neuronas granulares y la función hipocampal, desarrollamos unos ratones deficientes en AhR específicamente en los progenitores neuronales hipocampales (AhR KOci).

Mediante esta estrategia, en primer lugar, evaluamos la capacidad de proliferación de los progenitores neuronales en la ZSG en ausencia de AhR. Como sucedía en los deficientes constitutivos, nuestros datos muestran que la ausencia de AhR en estas células induce un aumento del número de neuronas nuevas inmaduras en la ZSG. Además, el estudio morfológico de estas neuronas nos permitió identificar un patrón de arborización dendrítico similar al que habíamos observado previamente en los animales AhR^{-/-}, con una mayor densidad de dendritas en la región más próxima al soma. Estos resultados nos permitieron descartar que los efectos observados en los animales AhR^{-/-} pudieran deberse a efectos indirectos compensatorios como consecuencia de la mutación constitutiva.

Al estudiar diferentes tipos de memoria dependientes de hipocampo pudimos observar de nuevo que los animales AhR KOci presentaban un comportamiento, similar al observado en los AhR^{-/-} tras la delección específica de AhR en los progenitores neuronales

Todos estos resultados apuntan a que alteraciones en la señalización de AhR en las nuevas neuronas granulares, o incluso cambios en la disponibilidad de activadores endógenos o exógenos de AhR, no solo podrían afectar a las propiedades morfológicas de las neuronas del hipocampo, sino también traer

consigo graves repercusiones en el funcionamiento hipocampal. De hecho, diversos estudios han demostrado que la exposición a dioxina interfiere con el desarrollo de la neurogénesis (Latchney et al., 2013; Williamson et al., 2005), por lo que alteraciones en la modulación de AhR por ligandos tales como los contaminantes ambientales a lo largo de la vida podría promover el desarrollo de alteraciones cognitivas como consecuencia de una disfunción hipocampal. Una posibilidad interesante es que ligandos endógenos de AhR, producidos en situaciones fisiológicas o patológicas, tengan un papel en la modulación de la neurogénesis de la ZSG y, por ende, en la memoria dependiente de hipocampo.

7

CONCLUSIONES

Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo de investigación se extraen las siguientes conclusiones:

1. La isquemia cerebral experimental por oclusión permanente de la arteria cerebral media en ratón produce un deterioro de la memoria a largo plazo de tipo contextual y espacial, ambas dependientes de hipocampo, que es paralelo a una alteración en la activación hipocampal durante el proceso de recuerdo.
2. En paralelo a las alteraciones cognitivas, la isquemia cerebral experimental promueve un incremento de la neurogénesis hipocampal que se mantiene hasta treinta días después de la oclusión, tanto en los hipocampos ipsi- como contralesionales junto con un aumento del volumen de la capa granular de esta estructura.
3. La exacerbación de la respuesta neurogénica tras isquemia cerebral mediante exposición a ejercicio físico voluntario o por el tratamiento con memantina potencia la neurogénesis a la vez que empeora el deterioro cognitivo.
4. La isquemia cerebral induce en las nuevas neuronas generadas la adquisición de una morfología aberrante, con rasgos diferenciales entre los hipocampos ipsi- y contralesionales tanto en las nuevas neuronas inmaduras como maduras.
5. La inhibición de la respuesta neurogénica tras isquemia cerebral por el tratamiento con temozolomida o utilizando animales NestinaCre^{ERT2}-NSE/ATD restaura los niveles neurogénicos hipocampales y bloquea el deterioro cognitivo.
6. La ausencia de AhR altera la memoria dependiente de hipocampo, específicamente, las memorias de tipo episódica y espacial.
7. La ausencia de AhR incrementa el *pool* de células madre, la proliferación y el número de nuevas neuronas en las zonas subventricular y subgranular del cerebro adulto de ratón.
8. La ausencia de AhR provoca una reducción tanto del *pool* de células madre hipocampales de tipo II como de la tasa proliferativa de células madre hipocampales de tipo I y II de manera dependiente de la edad.
9. La ausencia de AhR altera la morfología de las nuevas neuronas granulares del giro dentado.
10. La ausencia de AhR altera la excitabilidad intrínseca y la maduración de las espinas dendríticas de las neuronas granulares del giro dentado.

11. La delección específica de AhR en los progenitores neuronales hipocampales incrementa la neurogénesis y provoca cambios en la morfología de las nuevas neuronas granulares, de manera concomitante a la alteración de las memorias dependientes de hipocampo de tipo contextual y espacial.

Como sumario de los bloques que constituyen la presente Tesis Doctoral podemos extraer las dos siguientes conclusiones:

-La isquemia cerebral por oclusión de la arteria cerebral media en ratón induce déficits en la memoria dependiente del hipocampo, que se deben a una neurogénesis aumentada y a una morfología aberrante de neuronas granulares, que desemboca en la alteración de los circuitos hipocampales en los que se almacena la memoria.

-El receptor de hidrocarburos aromáticos (AhR) juega un papel clave en la generación, morfología y maduración sináptica de las nuevas neuronas granulares así como en la memoria dependiente del hipocampo.

Conclusions

1. Experimental ischemic stroke induced by the permanent occlusion of the middle cerebral artery in mice produces a long-term hippocampal-dependent contextual and spatial memory impairment with an alteration in hippocampal activation during the retrieval.
2. Besides cognitive impairment, experimental ischemic stroke promotes an augmented neurogenic burst lasting thirty days after the surgery in both, ipsi- and contralesional hippocampi together with an increased granular layer volume.
3. Physical exercise or memantine treatment enhance poststroke-induced neurogenesis and worsen cognitive impairment.
4. Ischemic stroke promotes the acquisition of a differential aberrant morphology in the ipsi- and contralesional hippocampus in both, immature and mature newborn neurons.
5. The inhibition of stroke-induced neurogenesis by temozolomide treatment or in NestinCre^{ERT2}-NSE/DTA mice restores hippocampal neurogenesis levels and blocks cognitive impairment.
6. AhR deletion impairs contextual, episodic and spatial hippocampal-dependent memories.
7. AhR deletion increases the neural stem cells pool, proliferation and the number of newborn neurons at the subventricular and subgranular zone in the adult mice brain.
8. AhR deletion promotes the exhaustion of the hippocampal neural stem cells pool type II besides the proliferative rate of neural stem cells pool type I and II in an age-dependent fashion.
9. AhR deletion alters the morphology of dentate gyrus newborn granule cells.
10. AhR deletion modifies the intrinsic excitability and impairs the synaptic maturation of the dentate gyrus granule cells.
11. AhR deletion in hippocampal neuroprogenitor cells increases neurogenesis and promotes alterations in the morphology of newborn granule cells, in parallel with an impairment in contextual and spatial hippocampal-dependent memories.

As a summary of this Doctoral Thesis, we can conclude that:

- *Focal cerebral ischemia caused by distal middle cerebral artery occlusion in mice induces hippocampal memory deficits that results from an enhanced neurogenesis and an aberrant morphology of newborn granule neurons, leading to an impairment of hippocampal circuits where memories are embedded.*
- *Aryl hydrocarbon receptor (AhR) plays a key role in the generation, morphology and synaptic maturation of newborn granule neurons and, subsequently, in hippocampus-dependent memory.*

8

ANEXOS

Publicaciones

- CUARTERO MI*, **DE LA PARRA J***, PEREZ-RUIZ A*, BRAVO-FERRER I, GARCIA-CULEBRAS A, GARCIA-SEGURA JM, LIZASOAIN I and MORO MA. *Abolition of aberrant neurogenesis ameliorates cognitive impairment after stroke*. Journal of Clinical Investigation. (*) Both authors contributed similarly to the article. **Under Editorial Review.**
- **DE LA PARRA J***, CUARTERO MI*, PEREZ-RUIZ A, GARCIA-CULEBRAS A, MARTIN R, SANCJEZ-PRIETO J, GARCIA-SEGURA JM, LIZASOAIN I and MORO MA. *AhR regulates newborn granule cell maturation and hippocampal memory*. eNeuro. (*) Both authors contributed similarly to the article. **Under Editorial Review.**
- GUSKJOLEN A, **DE LA PARRA J**, KENNEY JW, AMY B, JOSSELYN S and FRANKLAND PW. *Recovery of “lost” infant memories in mice*. Current Biology. **Under Editorial Review.**
- PALMA-TOROSA S, GARCÍA-CULEBRAS A, MORAGA A, HURTADO O, PEREZ-RUIZ A, DURÁN-LAFORET V, **DE LA PARRA J**, CUARTERO MI, PRADILLO JM, MORO MA and LIZASOAIN I. *Specific Features of SVZ Neurogenesis After Cortical Ischemia: a Longitudinal Study*. Scientific Reports. 2017.
- GARCÍA-CULEBRAS A, PALMA-TOROSA S, MORAGA A, GARCÍA-YÉBENES I, DURÁN-LAFORET V, CUARTERO MI, **DE LA PARRA J**, BARRIOS-MUÑOZ AL, DIAZ-GUZMÁN J, PRADILLO JM, MORO MA and LIZASOAIN I. *Toll-Like Receptor 4 Mediates Hemorrhagic Transformation After Delayed Tissue Plasminogen Activator Administration in In Situ Thromboembolic Stroke*. Stroke. 2017.
- CUARTERO MI*, **DE LA PARRA J***, GARCÍA-CULEBRAS A, BALLESTEROS I, LIZASOAIN I, MORO MA. *The Kynurenine pathway in the acute and chronic phases of cerebral ischemia*. Curr Pharm Des.(*) Both authors contributed similarly to the article. 2015.
- CUARTERO MI, BALLESTEROS I, **DE LA PARRA J**, HARKIN AL, ABAUTRET-DALY A, FERNÁNDEZ-SALGUEROP, CORBÍ AL, LIZASOAIN I, MORO MA. *L-kynurenine/aryl hydrocarbon receptor pathway mediates brain damage after experimental stroke*. Circulation 2014.
- BALLESTEROS I, CUARTERO MI, PRADILLO JM, **DE LA PARRA J**, PÉREZ-RUIZ A, CORBÍ A, RICOTE M, HAMILTON JA, SOBRADO M, VIVANCOS J, NOMBELA F, LIZASOAIN I, MORO MA. *Rosiglitazone-induced CD36 upregulation resolves inflammation by PPAR γ and 5-LO-dependent pathways*. J. Leukoc. Biol. 2014

9

BIBLIOGRAFIA

Referencias

- Acsády, L., Kamondi, A., Sík, A., Freund, T., and Buzsáki, G. (1998). GABAergic cells are the major postsynaptic targets of mossy fibers in the rat hippocampus. *J Neurosci* 18, 3386-3403.
- Aimone, J.B., Deng, W., and Gage, F.H. (2011). Resolving new memories: a critical look at the dentate gyrus, adult neurogenesis, and pattern separation. *Neuron* 70, 589-596.
- Aimone, J.B., Li, Y., Lee, S.W., Clemenson, G.D., Deng, W., and Gage, F.H. (2014). Regulation and function of adult neurogenesis: from genes to cognition. *Physiol Rev* 94, 991-1026.
- Aimone, J.B., Wiles, J., and Gage, F.H. (2009). Computational influence of adult neurogenesis on memory encoding. *Neuron* 61, 187-202.
- Akers, K.G., Martinez-Canabal, A., Restivo, L., Yiu, A.P., De Cristofaro, A., Hsiang, H.L., Wheeler, A.L., Guskjolen, A., Niibori, Y., Shoji, H., *et al.* (2014). Hippocampal neurogenesis regulates forgetting during adulthood and infancy. *Science* 344, 598-602.
- Alme, C.B., Buzzetti, R.A., Marrone, D.F., Leutgeb, J.K., Chawla, M.K., Schaner, M.J., Bohanick, J.D., Khoboko, T., Leutgeb, S., Moser, E.I., *et al.* (2010). Hippocampal granule cells opt for early retirement. *Hippocampus* 20, 1109-1123.
- ALTMAN, J. (1962). Are new neurons formed in the brains of adult mammals? *Science* 135, 1127-1128.
- ALTMAN, J., and CHOROVER, S.L. (1963). AUTORADIOGRAPHIC INVESTIGATION OF THE DISTRIBUTION AND UTILIZATION OF INTRAVENTRICULARLY INJECTED ADENINE-3H, URACIL-3H AND THYMIDINE-3H IN THE BRAINS OF CATS. *J Physiol* 169, 770-779.
- Alvarez Sabín, J., Alonso de Leciñana, M., Gállego, J., Gil-Peralta, A., Casado, I., Castillo, J., Díez Tejedor, E., Gil, A., Jiménez, C., Lago, A., *et al.* (2006). [Plan for stroke healthcare delivery]. *Neurologia* 21, 717-726.
- Amarenco, P., Bogousslavsky, J., Caplan, L.R., Donnan, G.A., and Hennerici, M.G. (2009). Classification of stroke subtypes. *Cerebrovasc Dis* 27, 493-501.
- Anacker, C., and Hen, R. (2017). Adult hippocampal neurogenesis and cognitive flexibility - linking memory and mood. *Nat Rev Neurosci* 18, 335-346.
- Arvidsson, A., Collin, T., Kirik, D., Kokaia, Z., and Lindvall, O. (2002). Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat Med* 8, 963-970.
- Arvidsson, A., Kokaia, Z., and Lindvall, O. (2001). N-methyl-D-aspartate receptor-mediated increase of neurogenesis in adult rat dentate gyrus following stroke. *Eur J Neurosci* 14, 10-18.
- Bandiera, S., Safe, S., and Okey, A.B. (1982). Binding of polychlorinated biphenyls classified as either phenobarbitone-, 3-methylcholanthrene- or mixed-type inducers to cytosolic Ah receptor. *Chem Biol Interact* 39, 259-277.
- Barouki, R., Coumoul, X., and Fernandez-Salguero, P.M. (2007). The aryl hydrocarbon receptor, more than a xenobiotic-interacting protein. *FEBS Lett* 581, 3608-3615.
- Barron, M.G., Heintz, R., and Rice, S.D. (2004). Relative potency of PAHs and heterocycles as aryl hydrocarbon receptor agonists in fish. *Mar Environ Res* 58, 95-100.
- Bassani, S., Folci, A., Zapata, J., and Passafaro, M. (2013). AMPAR trafficking in synapse maturation and plasticity. *Cell Mol Life Sci* 70, 4411-4430.
- Becker, S., and Wojtowicz, J.M. (2007). A model of hippocampal neurogenesis in memory and mood disorders. *Trends Cogn Sci* 11, 70-76.

- Belarbi, K., Arellano, C., Ferguson, R., Jopson, T., and Rosi, S. (2012). Chronic neuroinflammation impacts the recruitment of adult-born neurons into behaviorally relevant hippocampal networks. *Brain Behav Immun* 26, 18-23.
- Belarbi, K., and Rosi, S. (2013). Modulation of adult-born neurons in the inflamed hippocampus. *Front Cell Neurosci* 7, 145.
- Bleich, S., Wiltfang, J., and Kornhuber, J. (2003). Memantine in moderate-to-severe Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 349, 609-610; author reply 609-610.
- Boitano, A.E., Wang, J., Romeo, R., Bouchez, L.C., Parker, A.E., Sutton, S.E., Walker, J.R., Flaveny, C.A., Perdew, G.H., Denison, M.S., *et al.* (2010). Aryl hydrocarbon receptor antagonists promote the expansion of human hematopoietic stem cells. *Science* 329, 1345-1348.
- Boldrini, M., Fulmore, C.A., Tartt, A.N., Simeon, L.R., Pavlova, I., Poposka, V., Rosoklija, G.B., Stankov, A., Arango, V., Dwork, A.J., *et al.* (2018). Human Hippocampal Neurogenesis Persists throughout Aging. *Cell Stem Cell* 22, 589-599.e585.
- Brainin, M., Tuomilehto, J., Heiss, W.D., Bornstein, N.M., Bath, P.M., Teuschl, Y., Richard, E., Guekht, A., Quinn, T., and Group, P.S.C.S. (2015). Post-stroke cognitive decline: an update and perspectives for clinical research. *Eur J Neurol* 22, 229-238, e213-226.
- Bravo-Ferrer, I., Cuartero, M.I., Zarruk, J.G., Pradillo, J.M., Hurtado, O., Romera, V.G., Díaz-Alonso, J., García-Segura, J.M., Guzmán, M., Lizasoain, I., *et al.* (2017). Cannabinoid Type-2 Receptor Drives Neurogenesis and Improves Functional Outcome After Stroke. *Stroke* 48, 204-212.
- Brickley, S.G., Farrant, M., Swanson, G.T., and Cull-Candy, S.G. (2001). CNQX increases GABA-mediated synaptic transmission in the cerebellum by an AMPA/kainate receptor-independent mechanism. *Neuropharmacology* 41, 730-736.
- Cameron, H.A., Woolley, C.S., McEwen, B.S., and Gould, E. (1993). Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuroscience* 56, 337-344.
- Cancino, G.I., Yiu, A.P., Fatt, M.P., Dugani, C.B., Flores, E.R., Frankland, P.W., Josselyn, S.A., Miller, F.D., and Kaplan, D.R. (2013). p63 Regulates adult neural precursor and newly born neuron survival to control hippocampal-dependent Behavior. *J Neurosci* 33, 12569-12585.
- Carlisle, H.J., and Kennedy, M.B. (2005). Spine architecture and synaptic plasticity. *Trends Neurosci* 28, 182-187.
- Carreira, V.S., Fan, Y., Kurita, H., Wang, Q., Ko, C.I., Naticchioni, M., Jiang, M., Koch, S., Zhang, X., Biesiada, J., *et al.* (2015). Disruption of Ah Receptor Signaling during Mouse Development Leads to Abnormal Cardiac Structure and Function in the Adult. *PLoS One* 10, e0142440.
- Carver, L.A., and Bradfield, C.A. (1997). Ligand-dependent interaction of the aryl hydrocarbon receptor with a novel immunophilin homolog in vivo. *J Biol Chem* 272, 11452-11456.
- Celone, K.A., Calhoun, V.D., Dickerson, B.C., Atri, A., Chua, E.F., Miller, S.L., DePeau, K., Rentz, D.M., Selkoe, D.J., Blacker, D., *et al.* (2006). Alterations in memory networks in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: an independent component analysis. *J Neurosci* 26, 10222-10231.
- Chambers, R.A., Potenza, M.N., Hoffman, R.E., and Miranker, W. (2004). Simulated apoptosis/neurogenesis regulates learning and memory capabilities of adaptive neural networks. *Neuropsychopharmacology* 29, 747-758.
- Chater, T.E., and Goda, Y. (2014). The role of AMPA receptors in postsynaptic mechanisms of synaptic plasticity. *Front Cell Neurosci* 8, 401.
- Chen, P.H., Gao, S., Wang, Y.J., Xu, A.D., Li, Y.S., and Wang, D. (2012). Classifying Ischemic Stroke, from TOAST to CISS. *CNS Neurosci Ther* 18, 452-456.

- Ciolino, H.P., Daschner, P.J., and Yeh, G.C. (1999). Dietary flavonols quercetin and kaempferol are ligands of the aryl hydrocarbon receptor that affect CYP1A1 transcription differentially. *Biochem J* 340 (Pt 3), 715-722.
- Clelland, C.D., Choi, M., Romberg, C., Clemenson, G.D., Fragniere, A., Tyers, P., Jessberger, S., Saksida, L.M., Barker, R.A., Gage, F.H., *et al.* (2009). A functional role for adult hippocampal neurogenesis in spatial pattern separation. *Science* 325, 210-213.
- Conney, A.H. (1982). Induction of microsomal enzymes by foreign chemicals and carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons: G. H. A. Clowes Memorial Lecture. *Cancer Res* 42, 4875-4917.
- Cramer, S.C., Sur, M., Dobkin, B.H., O'Brien, C., Sanger, T.D., Trojanowski, J.Q., Rumsey, J.M., Hicks, R., Cameron, J., Chen, D., *et al.* (2011). Harnessing neuroplasticity for clinical applications. *Brain* 134, 1591-1609.
- Crews, S.T., and Brenman, J.E. (2006). Spineless provides a little backbone for dendritic morphogenesis. *Genes Dev* 20, 2773-2778.
- Crews, S.T., and Fan, C.M. (1999). Remembrance of things PAS: regulation of development by bHLH-PAS proteins. *Curr Opin Genet Dev* 9, 580-587.
- Cuartero, M.I., Ballesteros, I., de la Parra, J., Harkin, A.L., Abautret-Daly, A., Sherwin, E., Fernández-Salguero, P., Corbí, A.L., Lizasoain, I., and Moro, M.A. (2014). L-kynurenine/aryl hydrocarbon receptor pathway mediates brain damage after experimental stroke. *Circulation* 130, 2040-2051.
- Darsalia, V., Heldmann, U., Lindvall, O., and Kokaia, Z. (2005). Stroke-induced neurogenesis in aged brain. *Stroke* 36, 1790-1795.
- Deisseroth, K., Singla, S., Toda, H., Monje, M., Palmer, T.D., and Malenka, R.C. (2004). Excitation-neurogenesis coupling in adult neural stem/progenitor cells. *Neuron* 42, 535-552.
- Deng, W., Aimone, J.B., and Gage, F.H. (2010). New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nat Rev Neurosci* 11, 339-350.
- Denis, M., Cuthill, S., Wikström, A.C., Poellinger, L., and Gustafsson, J.A. (1988). Association of the dioxin receptor with the Mr 90,000 heat shock protein: a structural kinship with the glucocorticoid receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 155, 801-807.
- Denison, M.S., Fisher, J.M., and Whitlock, J.P. (1988). The DNA recognition site for the dioxin-Ah receptor complex. Nucleotide sequence and functional analysis. *J Biol Chem* 263, 17221-17224.
- Dickerson, B.C., Salat, D.H., Bates, J.F., Atiya, M., Killiany, R.J., Greve, D.N., Dale, A.M., Stern, C.E., Blacker, D., Albert, M.S., *et al.* (2004). Medial temporal lobe function and structure in mild cognitive impairment. *Ann Neurol* 56, 27-35.
- Dieni, C.V., Panichi, R., Aimone, J.B., Kuo, C.T., Wadiche, J.I., and Overstreet-Wadiche, L. (2016). Low excitatory innervation balances high intrinsic excitability of immature dentate neurons. *Nat Commun* 7, 11313.
- Dupret, D., Revest, J.M., Koehl, M., Ichas, F., De Giorgi, F., Costet, P., Abrous, D.N., and Piazza, P.V. (2008). Spatial relational memory requires hippocampal adult neurogenesis. *PLoS One* 3, e1959.
- Díez-Tejedor, E., del Brutto, O., Alvarez Sabín, J., Muñoz, M., Abiusi, G., and Cerebrovasculares, S.I.d.E. (2001). [Classification of the cerebrovascular diseases. Iberoamerican Cerebrovascular diseases Society]. *Rev Neurol* 33, 455-464.
- Enciu, A.M., and Popescu, B.O. (2013). Is there a causal link between inflammation and dementia? *Biomed Res Int* 2013, 316495.
- Epp, J.R., Spritzer, M.D., and Galea, L.A. (2007). Hippocampus-dependent learning promotes survival of new neurons in the dentate gyrus at a specific time during cell maturation. *Neuroscience* 149, 273-285.

- Ergul, A., Alhusban, A., and Fagan, S.C. (2012). Angiogenesis: a harmonized target for recovery after stroke. *Stroke* 43, 2270-2274.
- Erickson, K.I., Voss, M.W., Prakash, R.S., Basak, C., Szabo, A., Chaddock, L., Kim, J.S., Heo, S., Alves, H., White, S.M., *et al.* (2011). Exercise training increases size of hippocampus and improves memory. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 3017-3022.
- Eriksson, P.S., Perfilieva, E., Björk-Eriksson, T., Alborn, A.M., Nordborg, C., Peterson, D.A., and Gage, F.H. (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 4, 1313-1317.
- Espósito, M.S., Piatti, V.C., Laplagne, D.A., Morgenstern, N.A., Ferrari, C.C., Pitossi, F.J., and Schinder, A.F. (2005). Neuronal differentiation in the adult hippocampus recapitulates embryonic development. *J Neurosci* 25, 10074-10086.
- Fedele, V., Roybon, L., Nordström, U., Li, J.Y., and Brundin, P. (2011). Neurogenesis in the R6/2 mouse model of Huntington's disease is impaired at the level of NeuroD1. *Neuroscience* 173, 76-81.
- Fernandez-Salguero, P., Pineau, T., Hilbert, D.M., McPhail, T., Lee, S.S., Kimura, S., Nebert, D.W., Rudikoff, S., Ward, J.M., and Gonzalez, F.J. (1995). Immune system impairment and hepatic fibrosis in mice lacking the dioxin-binding Ah receptor. *Science* 268, 722-726.
- Fernandez-Salguero, P.M., Hilbert, D.M., Rudikoff, S., Ward, J.M., and Gonzalez, F.J. (1996). Aryl-hydrocarbon receptor-deficient mice are resistant to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 140, 173-179.
- Fernandez-Salguero, P.M., Ward, J.M., Sundberg, J.P., and Gonzalez, F.J. (1997). Lesions of aryl-hydrocarbon receptor-deficient mice. *Vet Pathol* 34, 605-614.
- Floel, A., and Cohen, L.G. (2010). Recovery of function in humans: cortical stimulation and pharmacological treatments after stroke. *Neurobiol Dis* 37, 243-251.
- Francescutti, C., Mariotti, S., Simon, G., D'Errigo, P., and Di Bidino, R. (2005). The impact of stroke in Italy: first step for a National Burden of Disease Study. *Disabil Rehabil* 27, 229-240.
- Frankland, P.W., Köhler, S., and Josselyn, S.A. (2013). Hippocampal neurogenesis and forgetting. *Trends Neurosci* 36, 497-503.
- Fujii-Kuriyama, Y., and Mimura, J. (2005). Molecular mechanisms of AhR functions in the regulation of cytochrome P450 genes. *Biochem Biophys Res Commun* 338, 311-317.
- Furness, S.G., and Whelan, F. (2009). The pleiotropy of dioxin toxicity--xenobiotic misappropriation of the aryl hydrocarbon receptor's alternative physiological roles. *Pharmacol Ther* 124, 336-353.
- Ge, S., Sailor, K.A., Ming, G.L., and Song, H. (2008). Synaptic integration and plasticity of new neurons in the adult hippocampus. *J Physiol* 586, 3759-3765.
- Ge, S., Yang, C.H., Hsu, K.S., Ming, G.L., and Song, H. (2007). A critical period for enhanced synaptic plasticity in newly generated neurons of the adult brain. *Neuron* 54, 559-566.
- Gorelick, P.B., and Roman, G.C. (1993). Vascular dementia: a time to 'seize the moment'. *Neuroepidemiology* 12, 139-140.
- Gorelick, P.B., Scuteri, A., Black, S.E., Decarli, C., Greenberg, S.M., Iadecola, C., Launer, L.J., Laurent, S., Lopez, O.L., Nyenhuis, D., *et al.* (2011). Vascular contributions to cognitive impairment and dementia: a statement for healthcare professionals from the american heart association/american stroke association. *Stroke* 42, 2672-2713.
- Gould, E., Tanapat, P., Hastings, N.B., and Shors, T.J. (1999). Neurogenesis in adulthood: a possible role in learning. *Trends Cogn Sci* 3, 186-192.
- Gouédard, C., Barouki, R., and Morel, Y. (2004). Dietary polyphenols increase paraoxonase 1 gene expression by an aryl hydrocarbon receptor-dependent mechanism. *Mol Cell Biol* 24, 5209-5222.

- Hachinski, V.C., and Bowler, J.V. (1993). Vascular dementia. *Neurology* 43, 2159-2160; author reply 2160-2151.
- Hachinski, V.C., Lassen, N.A., and Marshall, J. (1974). Multi-infarct dementia. A cause of mental deterioration in the elderly. *Lancet* 2, 207-210.
- Hankinson, O. (1995). The aryl hydrocarbon receptor complex. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 35, 307-340.
- Hasselmo, M.E., Wyble, B.P., and Wallenstein, G.V. (1996). Encoding and retrieval of episodic memories: role of cholinergic and GABAergic modulation in the hippocampus. *Hippocampus* 6, 693-708.
- Heid, S.E., Pollenz, R.S., and Swanson, H.I. (2000). Role of heat shock protein 90 dissociation in mediating agonist-induced activation of the aryl hydrocarbon receptor. *Mol Pharmacol* 57, 82-92.
- Higginbotham, G.R., Huang, A., Firestone, D., Verrett, J., Ress, J., and Campbell, A.D. (1968). Chemical and toxicological evaluations of isolated and synthetic chloro derivatives of dibenzo-p-dioxin. *Nature* 220, 702-703.
- Hinnell, C., Hurt, C.S., Landau, S., Brown, R.G., Samuel, M., and Group, P.-P.S. (2012). Nonmotor versus motor symptoms: how much do they matter to health status in Parkinson's disease? *Mov Disord* 27, 236-241.
- Huang, X., Powell-Coffman, J.A., and Jin, Y. (2004). The AHR-1 aryl hydrocarbon receptor and its co-factor the AHA-1 aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator specify GABAergic neuron cell fate in *C. elegans*. *Development* 131, 819-828.
- Huang, Y., Chen, J., Htut, W.M., Lai, X., and Wik, G. (2007). Acupuncture increases cerebral glucose metabolism in human vascular dementia. *Int J Neurosci* 117, 1029-1037.
- Hughes, C.P., Berg, L., Danziger, W.L., Coben, L.A., and Martin, R.L. (1982). A new clinical scale for the staging of dementia. *Br J Psychiatry* 140, 566-572.
- Hurd, M.D., Martorell, P., Delavande, A., Mullen, K.J., and Langa, K.M. (2013). Monetary costs of dementia in the United States. *N Engl J Med* 368, 1326-1334.
- Hämäläinen, A., Pihlajamäki, M., Tanila, H., Hänninen, T., Niskanen, E., Tervo, S., Karjalainen, P.A., Vanninen, R.L., and Soininen, H. (2007). Increased fMRI responses during encoding in mild cognitive impairment. *Neurobiol Aging* 28, 1889-1903.
- Iadecola, C. (2013). The pathobiology of vascular dementia. *Neuron* 80, 844-866.
- Iadecola, C., and Anrather, J. (2011). The immunology of stroke: from mechanisms to translation. *Nat Med* 17, 796-808.
- Ikuta, T., Eguchi, H., Tachibana, T., Yoneda, Y., and Kawajiri, K. (1998). Nuclear localization and export signals of the human aryl hydrocarbon receptor. *J Biol Chem* 273, 2895-2904.
- Jessberger, S., Zhao, C., Toni, N., Clemenson, G.D., Li, Y., and Gage, F.H. (2007). Seizure-associated, aberrant neurogenesis in adult rats characterized with retrovirus-mediated cell labeling. *J Neurosci* 27, 9400-9407.
- Jin, K., Wang, X., Xie, L., Mao, X.O., and Greenberg, D.A. (2010). Transgenic ablation of doublecortin-expressing cells suppresses adult neurogenesis and worsens stroke outcome in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 7993-7998.
- Jin, K., Wang, X., Xie, L., Mao, X.O., Zhu, W., Wang, Y., Shen, J., Mao, Y., Banwait, S., and Greenberg, D.A. (2006). Evidence for stroke-induced neurogenesis in the human brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 13198-13202.
- Johnston, S.C., Mendis, S., and Mathers, C.D. (2009). Global variation in stroke burden and mortality: estimates from monitoring, surveillance, and modelling. *Lancet Neurol* 8, 345-354.
- Jokinen, H., Melkas, S., Ylikoski, R., Pohjasvaara, T., Kaste, M., Erkinjuntti, T., and Hietanen, M. (2015). Post-stroke cognitive impairment is common even after successful clinical recovery. *Eur J Neurol* 22, 1288-1294.

- Jones, T.A. (2017). Motor compensation and its effects on neural reorganization after stroke. *Nat Rev Neurosci* 18, 267-280.
- Josselyn, S.A. (2010). Continuing the search for the engram: examining the mechanism of fear memories. *J Psychiatry Neurosci* 35, 221-228.
- Josselyn, S.A., and Frankland, P.W. (2012). Infantile amnesia: a neurogenic hypothesis. *Learn Mem* 19, 423-433.
- Juricek, L., Carcaud, J., Pelhaitre, A., Riday, T.T., Chevallier, A., Lanzini, J., Auzeil, N., Laprévote, O., Dumont, F., Jacques, S., *et al.* (2017). AhR-deficiency as a cause of demyelinating disease and inflammation. *Sci Rep* 7, 9794.
- Kaiser, E., Kuzmits, R., Pregant, P., Burghuber, O., and Worofka, W. (1989). Clinical biochemistry of neuron specific enolase. *Clin Chim Acta* 183, 13-31.
- Kaplan, M.S. (1981). Neurogenesis in the 3-month-old rat visual cortex. *J Comp Neurol* 195, 323-338.
- Kaplan, M.S., and Hinds, J.W. (1977). Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science* 197, 1092-1094.
- Kazlauskas, A., Poellinger, L., and Pongratz, I. (1999). Evidence that the co-chaperone p23 regulates ligand responsiveness of the dioxin (Aryl hydrocarbon) receptor. *J Biol Chem* 274, 13519-13524.
- Kelly, J.R., Kennedy, P.J., Cryan, J.F., Dinan, T.G., Clarke, G., and Hyland, N.P. (2015). Breaking down the barriers: the gut microbiome, intestinal permeability and stress-related psychiatric disorders. *Front Cell Neurosci* 9, 392.
- Kempermann, G., Kuhn, H.G., and Gage, F.H. (1997). More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 386, 493-495.
- Kernie, S.G., and Parent, J.M. (2010). Forebrain neurogenesis after focal Ischemic and traumatic brain injury. *Neurobiol Dis* 37, 267-274.
- Kewley, R.J., Whitelaw, M.L., and Chapman-Smith, A. (2004). The mammalian basic helix-loop-helix/PAS family of transcriptional regulators. *Int J Biochem Cell Biol* 36, 189-204.
- Kheirbek, M.A., Drew, L.J., Burghardt, N.S., Costantini, D.O., Tannenholz, L., Ahmari, S.E., Zeng, H., Fenton, A.A., and Hen, R. (2013). Differential control of learning and anxiety along the dorsoventral axis of the dentate gyrus. *Neuron* 77, 955-968.
- Kim, E.J., Leung, C.T., Reed, R.R., and Johnson, J.E. (2007). In vivo analysis of Ascl1 defined progenitors reveals distinct developmental dynamics during adult neurogenesis and gliogenesis. *J Neurosci* 27, 12764-12774.
- Kim, H.A., Kim, E.M., Park, Y.C., Yu, J.Y., Hong, S.K., Jeon, S.H., Park, K.L., Hur, S.J., and Heo, Y. (2003). Immunotoxicological effects of Agent Orange exposure to the Vietnam War Korean veterans. *Ind Health* 41, 158-166.
- Kim, M.D., Jan, L.Y., and Jan, Y.N. (2006). The bHLH-PAS protein Spineless is necessary for the diversification of dendrite morphology of Drosophila dendritic arborization neurons. *Genes Dev* 20, 2806-2819.
- Kimura, E., Ding, Y., and Tohyama, C. (2016). AhR signaling activation disrupts migration and dendritic growth of olfactory interneurons in the developing mouse. *Sci Rep* 6, 26386.
- Kimura, E., Kubo, K.I., Endo, T., Nakajima, K., Takeyama, M., and Tohyama, C. (2017). Excessive activation of AhR signaling disrupts neuronal migration in the hippocampal CA1 region in the developing mouse. *J Toxicol Sci* 42, 25-30.
- Kimura, E., and Tohyama, C. (2017). Embryonic and Postnatal Expression of Aryl Hydrocarbon Receptor mRNA in Mouse Brain. *Front Neuroanat* 11, 4.
- Kohl, Z., Kandasamy, M., Winner, B., Aigner, R., Gross, C., Couillard-Despres, S., Bogdahn, U., Aigner, L., and Winkler, J. (2007). Physical activity fails to rescue hippocampal neurogenesis deficits in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. *Brain Res* 1155, 24-33.

- Kohl, Z., Regensburger, M., Aigner, R., Kandasamy, M., Winner, B., Aigner, L., and Winkler, J. (2010). Impaired adult olfactory bulb neurogenesis in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. *BMC Neurosci* 11, 114.
- Kokaia, Z., Thored, P., Arvidsson, A., and Lindvall, O. (2006). Regulation of stroke-induced neurogenesis in adult brain--recent scientific progress. *Cereb Cortex* 16 Suppl 1, i162-167.
- Latchney, S.E., Hein, A.M., O'Banion, M.K., DiCicco-Bloom, E., and Opanashuk, L.A. (2013). Deletion or activation of the aryl hydrocarbon receptor alters adult hippocampal neurogenesis and contextual fear memory. *J Neurochem* 125, 430-445.
- Lazarov, O., Mattson, M.P., Peterson, D.A., Pimplikar, S.W., and van Praag, H. (2010). When neurogenesis encounters aging and disease. *Trends Neurosci* 33, 569-579.
- Lazic, S.E., Grote, H., Armstrong, R.J., Blakemore, C., Hannan, A.J., van Dellen, A., and Barker, R.A. (2004). Decreased hippocampal cell proliferation in R6/1 Huntington's mice. *Neuroreport* 15, 811-813.
- Lees, M.J., and Whitelaw, M.L. (1999). Multiple roles of ligand in transforming the dioxin receptor to an active basic helix-loop-helix/PAS transcription factor complex with the nuclear protein Arnt. *Mol Cell Biol* 19, 5811-5822.
- Leuner, B., Gould, E., and Shors, T.J. (2006). Is there a link between adult neurogenesis and learning? *Hippocampus* 16, 216-224.
- Leuner, B., Mendolia-Loffredo, S., Kozorovitskiy, Y., Samburg, D., Gould, E., and Shors, T.J. (2004). Learning enhances the survival of new neurons beyond the time when the hippocampus is required for memory. *J Neurosci* 24, 7477-7481.
- Li, L., Harms, K.M., Ventura, P.B., Lagace, D.C., Eisch, A.J., and Cunningham, L.A. (2010a). Focal cerebral ischemia induces a multilineage cytogenic response from adult subventricular zone that is predominantly gliogenic. *Glia* 58, 1610-1619.
- Li, S., Overman, J.J., Katsman, D., Kozlov, S.V., Donnelly, C.J., Twiss, J.L., Giger, R.J., Coppola, G., Geschwind, D.H., and Carmichael, S.T. (2010b). An age-related sprouting transcriptome provides molecular control of axonal sprouting after stroke. *Nat Neurosci* 13, 1496-1504.
- Li, W.L., Cai, H.H., Wang, B., Chen, L., Zhou, Q.G., Luo, C.X., Liu, N., Ding, X.S., and Zhu, D.Y. (2009). Chronic fluoxetine treatment improves ischemia-induced spatial cognitive deficits through increasing hippocampal neurogenesis after stroke. *J Neurosci Res* 87, 112-122.
- Li, Y., Innocentin, S., Withers, D.R., Roberts, N.A., Gallagher, A.R., Grigorieva, E.F., Wilhelm, C., and Veldhoen, M. (2011). Exogenous stimuli maintain intraepithelial lymphocytes via aryl hydrocarbon receptor activation. *Cell* 147, 629-640.
- Lin, C.H., Chen, C.C., Chou, C.M., Wang, C.Y., Hung, C.C., Chen, J.Y., Chang, H.W., Chen, Y.C., Yeh, G.C., and Lee, Y.H. (2009). Knockdown of the aryl hydrocarbon receptor attenuates excitotoxicity and enhances NMDA-induced BDNF expression in cortical neurons. *J Neurochem* 111, 777-789.
- Liu, H., Kaur, J., Dashtipour, K., Kinyamu, R., Ribak, C.E., and Friedman, L.K. (2003). Suppression of hippocampal neurogenesis is associated with developmental stage, number of perinatal seizure episodes, and glucocorticosteroid level. *Exp Neurol* 184, 196-213.
- Liu, H., and Zhang, J. (2012). Cerebral hypoperfusion and cognitive impairment: the pathogenic role of vascular oxidative stress. *Int J Neurosci* 122, 494-499.
- Lopez-Rojas, J., and Kreutz, M.R. (2016). Mature granule cells of the dentate gyrus--Passive bystanders or principal performers in hippocampal function? *Neurosci Biobehav Rev* 64, 167-174.
- Lozano, R., Naghavi, M., Foreman, K., Lim, S., Shibuya, K., Aboyans, V., Abraham, J., Adair, T., Aggarwal, R., Ahn, S.Y., *et al.* (2012). Global and regional mortality

- from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* 380, 2095-2128.
- Lugert, S., Basak, O., Knuckles, P., Haussler, U., Fabel, K., Götz, M., Haas, C.A., Kempermann, G., Taylor, V., and Giachino, C. (2010). Quiescent and active hippocampal neural stem cells with distinct morphologies respond selectively to physiological and pathological stimuli and aging. *Cell Stem Cell* 6, 445-456.
 - Luo, C.X., Jiang, J., Zhou, Q.G., Zhu, X.J., Wang, W., Zhang, Z.J., Han, X., and Zhu, D.Y. (2007). Voluntary exercise-induced neurogenesis in the postischemic dentate gyrus is associated with spatial memory recovery from stroke. *J Neurosci Res* 85, 1637-1646.
 - López-Valdés, H.E., Clarkson, A.N., Ao, Y., Charles, A.C., Carmichael, S.T., Sofroniew, M.V., and Brennan, K.C. (2014). Memantine enhances recovery from stroke. *Stroke* 45, 2093-2100.
 - Ma, Q., and Whitlock, J.P. (1997). A novel cytoplasmic protein that interacts with the Ah receptor, contains tetratricopeptide repeat motifs, and augments the transcriptional response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *J Biol Chem* 272, 8878-8884.
 - Ma, X., Sun, Z., Liu, Y., Jia, Y., Zhang, B., and Zhang, J. (2013). Resveratrol improves cognition and reduces oxidative stress in rats with vascular dementia. *Neural Regen Res* 8, 2050-2059.
 - Maekawa, M., Namba, T., Suzuki, E., Yuasa, S., Kohsaka, S., and Uchino, S. (2009). NMDA receptor antagonist memantine promotes cell proliferation and production of mature granule neurons in the adult hippocampus. *Neurosci Res* 63, 259-266.
 - Mandal, P.K. (2005). Dioxin: a review of its environmental effects and its aryl hydrocarbon receptor biology. *J Comp Physiol B* 175, 221-230.
 - Mang, C.S., Campbell, K.L., Ross, C.J., and Boyd, L.A. (2013). Promoting neuroplasticity for motor rehabilitation after stroke: considering the effects of aerobic exercise and genetic variation on brain-derived neurotrophic factor. *Phys Ther* 93, 1707-1716.
 - Marlatt, M.W., and Lucassen, P.J. (2010). Neurogenesis and Alzheimer's disease: Biology and pathophysiology in mice and men. *Curr Alzheimer Res* 7, 113-125.
 - Marvanová, M., Lakso, M., Pirhonen, J., Nawa, H., Wong, G., and Castrén, E. (2001). The neuroprotective agent memantine induces brain-derived neurotrophic factor and trkB receptor expression in rat brain. *Mol Cell Neurosci* 18, 247-258.
 - Marín-Burgin, A., and Schinder, A.F. (2012). Requirement of adult-born neurons for hippocampus-dependent learning. *Behav Brain Res* 227, 391-399.
 - Matikainen, T., Perez, G.I., Jurisicova, A., Pru, J.K., Schlezinger, J.J., Ryu, H.Y., Laine, J., Sakai, T., Korsmeyer, S.J., Casper, R.F., *et al.* (2001). Aromatic hydrocarbon receptor-driven Bax gene expression is required for premature ovarian failure caused by biohazardous environmental chemicals. *Nat Genet* 28, 355-360.
 - Matthews, F.E., Arthur, A., Barnes, L.E., Bond, J., Jagger, C., Robinson, L., Brayne, C., and Collaboration, M.R.C.C.F.a.A. (2013). A two-decade comparison of prevalence of dementia in individuals aged 65 years and older from three geographical areas of England: results of the Cognitive Function and Ageing Study I and II. *Lancet* 382, 1405-1412.
 - McKinney, J.D., and Singh, P. (1981). Structure-activity relationships in halogenated biphenyls: unifying hypothesis for structural specificity. *Chem Biol Interact* 33, 271-283.
 - McNaughton, N., and Morris, R.G. (1987). Chlordiazepoxide, an anxiolytic benzodiazepine, impairs place navigation in rats. *Behav Brain Res* 24, 39-46.
 - Meltzer, L.A., Yabaluri, R., and Deisseroth, K. (2005). A role for circuit homeostasis in adult neurogenesis. *Trends Neurosci* 28, 653-660.

- Meyer, B.K., Pray-Grant, M.G., Vanden Heuvel, J.P., and Perdew, G.H. (1998). Hepatitis B virus X-associated protein 2 is a subunit of the unliganded aryl hydrocarbon receptor core complex and exhibits transcriptional enhancer activity. *Mol Cell Biol* 18, 978-988.
- Mimura, J., and Fujii-Kuriyama, Y. (2003). Functional role of AhR in the expression of toxic effects by TCDD. *Biochim Biophys Acta* 1619, 263-268.
- Mimura, J., Yamashita, K., Nakamura, K., Morita, M., Takagi, T.N., Nakao, K., Ema, M., Sogawa, K., Yasuda, M., Katsuki, M., *et al.* (1997). Loss of teratogenic response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in mice lacking the Ah (dioxin) receptor. *Genes Cells* 2, 645-654.
- Mirochnic, S., Wolf, S., Staufenbiel, M., and Kempermann, G. (2009). Age effects on the regulation of adult hippocampal neurogenesis by physical activity and environmental enrichment in the APP23 mouse model of Alzheimer disease. *Hippocampus* 19, 1008-1018.
- Mongiat, L.A., Espósito, M.S., Lombardi, G., and Schinder, A.F. (2009). Reliable activation of immature neurons in the adult hippocampus. *PLoS One* 4, e5320.
- MOORE, B.W., and MCGREGOR, D. (1965). CHROMATOGRAPHIC AND ELECTROPHORETIC FRACTIONATION OF SOLUBLE PROTEINS OF BRAIN AND LIVER. *J Biol Chem* 240, 1647-1653.
- Moraga, A., Pradillo, J.M., Cuartero, M.I., Hernández-Jiménez, M., Osés, M., Moro, M.A., and Lizasoain, I. (2014). Toll-like receptor 4 modulates cell migration and cortical neurogenesis after focal cerebral ischemia. *FASEB J* 28, 4710-4718.
- Moskowitz, M.A., Lo, E.H., and Iadecola, C. (2010). The science of stroke: mechanisms in search of treatments. *Neuron* 67, 181-198.
- Mu, Y., and Gage, F.H. (2011). Adult hippocampal neurogenesis and its role in Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener* 6, 85.
- Mulero-Navarro, S., and Fernandez-Salguero, P.M. (2016). New Trends in Aryl Hydrocarbon Receptor Biology. *Front Cell Dev Biol* 4, 45.
- Murphy, T.H., and Corbett, D. (2009). Plasticity during stroke recovery: from synapse to behaviour. *Nat Rev Neurosci* 10, 861-872.
- Murray, I.A., Patterson, A.D., and Perdew, G.H. (2014). Aryl hydrocarbon receptor ligands in cancer: friend and foe. *Nat Rev Cancer* 14, 801-814.
- Nafstad, P.H. (1967). An electron microscope study on the termination of the perforant path fibres in the hippocampus and the fascia dentata. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 76, 532-542.
- Nguyen, L.P., and Bradfield, C.A. (2008). The search for endogenous activators of the aryl hydrocarbon receptor. *Chem Res Toxicol* 21, 102-116.
- Niv, F., Keiner, S., Krishna, -, Witte, O.W., Lie, D.C., and Redecker, C. (2012). Aberrant neurogenesis after stroke: a retroviral cell labeling study. *Stroke* 43, 2468-2475.
- Niwa, A., Kumaki, K., Nebert, D.W., and Poland, A.P. (1975). Genetic expression of aryl hydrocarbon hydroxylase activity in the mouse. Distinction between the "responsive" homozygote and heterozygote at the Ah locus. *Arch Biochem Biophys* 166, 559-564.
- Ohab, J.J., Fleming, S., Blesch, A., and Carmichael, S.T. (2006). A neurovascular niche for neurogenesis after stroke. *J Neurosci* 26, 13007-13016.
- Olesen, J., Gustavsson, A., Svensson, M., Wittchen, H.U., Jönsson, B., group, C.s., and Council, E.B. (2012). The economic cost of brain disorders in Europe. *Eur J Neurol* 19, 155-162.
- Orgogozo, J.M., Rigaud, A.S., Stöfler, A., Möbius, H.J., and Forette, F. (2002). Efficacy and safety of memantine in patients with mild to moderate vascular dementia: a randomized, placebo-controlled trial (MMM 300). *Stroke* 33, 1834-1839.
- Palma-Tortosa, S., García-Culebras, A., Moraga, A., Hurtado, O., Perez-Ruiz, A., Durán-Laforet, V., Parra, J., Cuartero, M.I., Pradillo, J.M., Moro, M.A., *et al.* (2017).

Specific Features of SVZ Neurogenesis After Cortical Ischemia: a Longitudinal Study. *Sci Rep* 7, 16343.

- Paoletti, P., Bellone, C., and Zhou, Q. (2013). NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nat Rev Neurosci* 14, 383-400.
- Parent, J.M., Elliott, R.C., Pleasure, S.J., Barbaro, N.M., and Lowenstein, D.H. (2006). Aberrant seizure-induced neurogenesis in experimental temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol* 59, 81-91.
- Parent, J.M., Yu, T.W., Leibowitz, R.T., Geschwind, D.H., Sloviter, R.S., and Lowenstein, D.H. (1997). Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus. *J Neurosci* 17, 3727-3738.
- Pazderova-Vejlková, J., Lukás, E., Němcová, M., Pícková, J., and Jirásek, L. (1981). The development and prognosis of chronic intoxication by tetrachlorodibenzo-p-dioxin in men. *Arch Environ Health* 36, 5-11.
- Pendlebury, S.T., and Rothwell, P.M. (2009). Prevalence, incidence, and factors associated with pre-stroke and post-stroke dementia: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol* 8, 1006-1018.
- Peng, Q., Masuda, N., Jiang, M., Li, Q., Zhao, M., Ross, C.A., and Duan, W. (2008). The antidepressant sertraline improves the phenotype, promotes neurogenesis and increases BDNF levels in the R6/2 Huntington's disease mouse model. *Exp Neurol* 210, 154-163.
- Perdew, G.H. (1988). Association of the Ah receptor with the 90-kDa heat shock protein. *J Biol Chem* 263, 13802-13805.
- Petrulis, J.R., Kusnadi, A., Ramadoss, P., Hollingshead, B., and Perdew, G.H. (2003). The hsp90 Co-chaperone XAP2 alters importin beta recognition of the bipartite nuclear localization signal of the Ah receptor and represses transcriptional activity. *J Biol Chem* 278, 2677-2685.
- Poland, A., and Glover, E. (1977). Chlorinated biphenyl induction of aryl hydrocarbon hydroxylase activity: a study of the structure-activity relationship. *Mol Pharmacol* 13, 924-938.
- Poland, A., Glover, E., and Taylor, B.A. (1987). The murine Ah locus: a new allele and mapping to chromosome 12. *Mol Pharmacol* 32, 471-478.
- Poland, A., and Knutson, J.C. (1982). 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: examination of the mechanism of toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 22, 517-554.
- Poland, A.P., Glover, E., Robinson, J.R., and Nebert, D.W. (1974). Genetic expression of aryl hydrocarbon hydroxylase activity. Induction of monooxygenase activities and cytochrome P1-450 formation by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in mice genetically "nonresponsive" to other aromatic hydrocarbons. *J Biol Chem* 249, 5599-5606.
- Pollenz, R.S., Sattler, C.A., and Poland, A. (1994). The aryl hydrocarbon receptor and aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein show distinct subcellular localizations in Hepa 1c1c7 cells by immunofluorescence microscopy. *Mol Pharmacol* 45, 428-438.
- Powers, B.E., Lin, T.M., Vanka, A., Peterson, R.E., Juraska, J.M., and Schantz, S.L. (2005). Tetrachlorodibenzo-p-dioxin exposure alters radial arm maze performance and hippocampal morphology in female AhR mice. *Genes Brain Behav* 4, 51-59.
- Qin, H., and Powell-Coffman, J.A. (2004). The *Caenorhabditis elegans* aryl hydrocarbon receptor, AHR-1, regulates neuronal development. *Dev Biol* 270, 64-75.
- Ramirez-Amaya, V., Marrone, D.F., Gage, F.H., Worley, P.F., and Barnes, C.A. (2006). Integration of new neurons into functional neural networks. *J Neurosci* 26, 12237-12241.

- Restivo, L., Niibori, Y., Mercaldo, V., Josselyn, S.A., and Frankland, P.W. (2015). Development of Adult-Generated Cell Connectivity with Excitatory and Inhibitory Cell Populations in the Hippocampus. *J Neurosci* 35, 10600-10612.
- Rey-Barroso, J., Alvarez-Barrientos, A., Rico-Leo, E., Contador-Troca, M., Carvajal-Gonzalez, J.M., Echarri, A., Del Pozo, M.A., and Fernandez-Salguero, P.M. (2014). The Dioxin receptor modulates Caveolin-1 mobilization during directional migration: role of cholesterol. *Cell Commun Signal* 12, 57.
- Reyes, H., Reisz-Porszasz, S., and Hankinson, O. (1992). Identification of the Ah receptor nuclear translocator protein (Arnt) as a component of the DNA binding form of the Ah receptor. *Science* 256, 1193-1195.
- Richards, B.A., and Frankland, P.W. (2017). The Persistence and Transience of Memory. *Neuron* 94, 1071-1084.
- Ritz, M.F., Grond-Ginsbach, C., Engelter, S., and Lyrer, P. (2012). Gene expression suggests spontaneously hypertensive rats may have altered metabolism and reduced hypoxic tolerance. *Curr Neurovasc Res* 9, 10-19.
- Rodríguez, J.J., Jones, V.C., Tabuchi, M., Allan, S.M., Knight, E.M., LaFerla, F.M., Oddo, S., and Verkhratsky, A. (2008). Impaired adult neurogenesis in the dentate gyrus of a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS One* 3, e2935.
- Rolls, A., Shechter, R., London, A., Ziv, Y., Ronen, A., Levy, R., and Schwartz, M. (2007). Toll-like receptors modulate adult hippocampal neurogenesis. *Nat Cell Biol* 9, 1081-1088.
- Rosamond, W., Flegal, K., Furie, K., Go, A., Greenlund, K., Haase, N., Hailpern, S.M., Ho, M., Howard, V., Kissela, B., *et al.* (2008). Heart disease and stroke statistics--2008 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* 117, e25-146.
- Rothman, S.M., Griffioen, K.J., Wan, R., and Mattson, M.P. (2012). Brain-derived neurotrophic factor as a regulator of systemic and brain energy metabolism and cardiovascular health. *Ann N Y Acad Sci* 1264, 49-63.
- Roybon, L., Hjalt, T., Stott, S., Guillemot, F., Li, J.Y., and Brundin, P. (2009). Neurogenin2 directs granule neuroblast production and amplification while NeuroD1 specifies neuronal fate during hippocampal neurogenesis. *PLoS One* 4, e4779.
- Safe, S. (1993). Toxicology, structure-function relationship, and human and environmental health impacts of polychlorinated biphenyls: progress and problems. *Environ Health Perspect* 100, 259-268.
- Safe, S., Bandiera, S., Sawyer, T., Robertson, L., Safe, L., Parkinson, A., Thomas, P.E., Ryan, D.E., Reik, L.M., and Levin, W. (1985). PCBs: structure-function relationships and mechanism of action. *Environ Health Perspect* 60, 47-56.
- Sahay, A., Scobie, K.N., Hill, A.S., O'Carroll, C.M., Kheirbek, M.A., Burghardt, N.S., Fenton, A.A., Dranovsky, A., and Hen, R. (2011). Increasing adult hippocampal neurogenesis is sufficient to improve pattern separation. *Nature* 472, 466-470.
- Schmidt-Hieber, C., Jonas, P., and Bischofberger, J. (2004). Enhanced synaptic plasticity in newly generated granule cells of the adult hippocampus. *Nature* 429, 184-187.
- Schrenk, D. (1998). Impact of dioxin-type induction of drug-metabolizing enzymes on the metabolism of endo- and xenobiotics. *Biochem Pharmacol* 55, 1155-1162.
- Schwetz, B.A., Norris, J.M., Sparschu, G.L., Rowe, U.K., Gehring, P.J., Emerson, J.L., and Gerbig, C.G. (1973). Toxicology of chlorinated dibenzo-p-dioxins. *Environ Health Perspect* 5, 87-99.
- Seki, T. (2002). Hippocampal adult neurogenesis occurs in a microenvironment provided by PSA-NCAM-expressing immature neurons. *J Neurosci Res* 69, 772-783.
- Seki, T. (2003). Microenvironmental elements supporting adult hippocampal neurogenesis. *Anat Sci Int* 78, 69-78.

- Sekine, H., Mimura, J., Oshima, M., Okawa, H., Kanno, J., Igarashi, K., Gonzalez, F.J., Ikuta, T., Kawajiri, K., and Fujii-Kuriyama, Y. (2009). Hypersensitivity of aryl hydrocarbon receptor-deficient mice to lipopolysaccharide-induced septic shock. *Mol Cell Biol* 29, 6391-6400.
- Shimada, T. (2006). Xenobiotic-metabolizing enzymes involved in activation and detoxification of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Drug Metab Pharmacokinet* 21, 257-276.
- Sierra, A., Encinas, J.M., Deudero, J.J., Chancey, J.H., Enikolopov, G., Overstreet-Wadiche, L.S., Tsirka, S.E., and Maletic-Savatic, M. (2010). Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis. *Cell Stem Cell* 7, 483-495.
- Simuni, T., and Sethi, K. (2008). Nonmotor manifestations of Parkinson's disease. *Ann Neurol* 64 Suppl 2, S65-80.
- Singer, B.H., Jutkiewicz, E.M., Fuller, C.L., Lichtenwalner, R.J., Zhang, H., Velander, A.J., Li, X., Gnegy, M.E., Burant, C.F., and Parent, J.M. (2009). Conditional ablation and recovery of forebrain neurogenesis in the mouse. *J Comp Neurol* 514, 567-582.
- Singh, K.P., Bennett, J.A., Casado, F.L., Walrath, J.L., Welle, S.L., and Gasiewicz, T.A. (2014). Loss of aryl hydrocarbon receptor promotes gene changes associated with premature hematopoietic stem cell exhaustion and development of a myeloproliferative disorder in aging mice. *Stem Cells Dev* 23, 95-106.
- Singh, S.S., Hord, N.G., and Perdew, G.H. (1996). Characterization of the activated form of the aryl hydrocarbon receptor in the nucleus of HeLa cells in the absence of exogenous ligand. *Arch Biochem Biophys* 329, 47-55.
- Smith, B.W., Rozelle, S.S., Leung, A., Ubellacker, J., Parks, A., Nah, S.K., French, D., Gadue, P., Monti, S., Chui, D.H., *et al.* (2013). The aryl hydrocarbon receptor directs hematopoietic progenitor cell expansion and differentiation. *Blood* 122, 376-385.
- Snyder, J.S., Choe, J.S., Clifford, M.A., Jeurling, S.I., Hurley, P., Brown, A., Kamhi, J.F., and Cameron, H.A. (2009). Adult-born hippocampal neurons are more numerous, faster maturing, and more involved in behavior in rats than in mice. *J Neurosci* 29, 14484-14495.
- Snyder, J.S., Ferrante, S.C., and Cameron, H.A. (2012). Late maturation of adult-born neurons in the temporal dentate gyrus. *PLoS One* 7, e48757.
- Song, H., Stevens, C.F., and Gage, F.H. (2002). Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature* 417, 39-44.
- Sorrells, S.F., Paredes, M.F., Cebrian-Silla, A., Sandoval, K., Qi, D., Kelley, K.W., James, D., Mayer, S., Chang, J., Auguste, K.I., *et al.* (2018). Human hippocampal neurogenesis drops sharply in children to undetectable levels in adults. *Nature* 555, 377-381.
- Spalding, K.L., Bergmann, O., Alkass, K., Bernard, S., Salehpour, M., Huttner, H.B., Boström, E., Westerlund, I., Vial, C., Buchholz, B.A., *et al.* (2013). Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans. *Cell* 153, 1219-1227.
- Spruston, N., and Johnston, D. (2008). Out of control in the dendrites. *Nat Neurosci* 11, 733-734.
- Steward, O., and Scoville, S.A. (1976). Cells of origin of entorhinal cortical afferents to the hippocampus and fascia dentata of the rat. *J Comp Neurol* 169, 347-370.
- Stone, S.S., Teixeira, C.M., Devito, L.M., Zaslavsky, K., Josselyn, S.A., Lozano, A.M., and Frankland, P.W. (2011). Stimulation of entorhinal cortex promotes adult neurogenesis and facilitates spatial memory. *J Neurosci* 31, 13469-13484.
- Stout, J.C., Paulsen, J.S., Queller, S., Solomon, A.C., Whitlock, K.B., Campbell, J.C., Carlozzi, N., Duff, K., Beglinger, L.J., Langbehn, D.R., *et al.* (2011). Neurocognitive signs in prodromal Huntington disease. *Neuropsychology* 25, 1-14.

- Sun, C., Sun, H., Wu, S., Lee, C.C., Akamatsu, Y., Wang, R.K., Kernie, S.G., and Liu, J. (2013). Conditional ablation of neuroprogenitor cells in adult mice impedes recovery of poststroke cognitive function and reduces synaptic connectivity in the perforant pathway. *J Neurosci* 33, 17314-17325.
- Swanson, H.I., Chan, W.K., and Bradfield, C.A. (1995). DNA binding specificities and pairing rules of the Ah receptor, ARNT, and SIM proteins. *J Biol Chem* 270, 26292-26302.
- Sánchez-Martín, F.J., Fernández-Salguero, P.M., and Merino, J.M. (2011). Aryl hydrocarbon receptor-dependent induction of apoptosis by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in cerebellar granule cells from mouse. *J Neurochem* 118, 153-162.
- Tada, T., and Sheng, M. (2006). Molecular mechanisms of dendritic spine morphogenesis. *Curr Opin Neurobiol* 16, 95-101.
- Tashiro, A., Makino, H., and Gage, F.H. (2007). Experience-specific functional modification of the dentate gyrus through adult neurogenesis: a critical period during an immature stage. *J Neurosci* 27, 3252-3259.
- Tatemichi, T.K., Desmond, D.W., Stern, Y., Paik, M., Sano, M., and Bagiella, E. (1994). Cognitive impairment after stroke: frequency, patterns, and relationship to functional abilities. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 57, 202-207.
- Taylor, B.L., and Zhulin, I.B. (1999). PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiol Mol Biol Rev* 63, 479-506.
- Thored, P., Arvidsson, A., Cacci, E., Ahlenius, H., Kallur, T., Darsalia, V., Ekdahl, C.T., Kokaia, Z., and Lindvall, O. (2006). Persistent production of neurons from adult brain stem cells during recovery after stroke. *Stem Cells* 24, 739-747.
- Thored, P., Wood, J., Arvidsson, A., Cammenga, J., Kokaia, Z., and Lindvall, O. (2007). Long-term neuroblast migration along blood vessels in an area with transient angiogenesis and increased vascularization after stroke. *Stroke* 38, 3032-3039.
- Toledo, J.B., Arnold, S.E., Raible, K., Brettschneider, J., Xie, S.X., Grossman, M., Monsell, S.E., Kukull, W.A., and Trojanowski, J.Q. (2013). Contribution of cerebrovascular disease in autopsy confirmed neurodegenerative disease cases in the National Alzheimer's Coordinating Centre. *Brain* 136, 2697-2706.
- Tombaugh, T.N., and McIntyre, N.J. (1992). The mini-mental state examination: a comprehensive review. *J Am Geriatr Soc* 40, 922-935.
- Tomlinson, B.E., Blessed, G., and Roth, M. (1970). Observations on the brains of demented old people. *J Neurol Sci* 11, 205-242.
- Toni, N., Laplagne, D.A., Zhao, C., Lombardi, G., Ribak, C.E., Gage, F.H., and Schinder, A.F. (2008). Neurons born in the adult dentate gyrus form functional synapses with target cells. *Nat Neurosci* 11, 901-907.
- Toni, N., Teng, E.M., Bushong, E.A., Aimone, J.B., Zhao, C., Consiglio, A., van Praag, H., Martone, M.E., Ellisman, M.H., and Gage, F.H. (2007). Synapse formation on neurons born in the adult hippocampus. *Nat Neurosci* 10, 727-734.
- Treves, A., and Rolls, E.T. (1994). Computational analysis of the role of the hippocampus in memory. *Hippocampus* 4, 374-391.
- Trotman, M., Vermehren, P., Gibson, C.L., and Fern, R. (2015). The dichotomy of memantine treatment for ischemic stroke: dose-dependent protective and detrimental effects. *J Cereb Blood Flow Metab* 35, 230-239.
- van Praag, H. (2009). Exercise and the brain: something to chew on. *Trends Neurosci* 32, 283-290.
- van Praag, H., Christie, B.R., Sejnowski, T.J., and Gage, F.H. (1999a). Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 13427-13431.
- van Praag, H., Kempermann, G., and Gage, F.H. (1999b). Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci* 2, 266-270.

- van Praag, H., Schinder, A.F., Christie, B.R., Toni, N., Palmer, T.D., and Gage, F.H. (2002). Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature* 415, 1030-1034.
- van Praag, H., Shubert, T., Zhao, C., and Gage, F.H. (2005). Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice. *J Neurosci* 25, 8680-8685.
- Vanden Heuvel, J.P., Clark, G.C., Thompson, C.L., McCoy, Z., Miller, C.R., Lucier, G.W., and Bell, D.A. (1993). CYP1A1 mRNA levels as a human exposure biomarker: use of quantitative polymerase chain reaction to measure CYP1A1 expression in human peripheral blood lymphocytes. *Carcinogenesis* 14, 2003-2006.
- Venkat, P., Chopp, M., and Chen, J. (2015). Models and mechanisms of vascular dementia. *Exp Neurol* 272, 97-108.
- Wang, X., Mao, X., Xie, L., Sun, F., Greenberg, D.A., and Jin, K. (2012). Conditional depletion of neurogenesis inhibits long-term recovery after experimental stroke in mice. *PLoS One* 7, e38932.
- Watson, A.J., and Hankinson, O. (1992). Dioxin- and Ah receptor-dependent protein binding to xenobiotic responsive elements and G-rich DNA studied by in vivo footprinting. *J Biol Chem* 267, 6874-6878.
- Weisz, V.I., and Argibay, P.F. (2012). Neurogenesis interferes with the retrieval of remote memories: forgetting in neurocomputational terms. *Cognition* 125, 13-25.
- Wen, S.W., and Wong, C.H.Y. (2017). An unexplored brain-gut microbiota axis in stroke. *Gut Microbes* 8, 601-606.
- Wilcock, G.K. (2003). Memantine for the treatment of dementia. *Lancet Neurol* 2, 503-505.
- Williamson, M.A., Gasiewicz, T.A., and Opanashuk, L.A. (2005). Aryl hydrocarbon receptor expression and activity in cerebellar granule neuroblasts: implications for development and dioxin neurotoxicity. *Toxicol Sci* 83, 340-348.
- Wilson, C.L., and Safe, S. (1998). Mechanisms of ligand-induced aryl hydrocarbon receptor-mediated biochemical and toxic responses. *Toxicol Pathol* 26, 657-671.
- Wimo, A., Guerchet, M., Ali, G.C., Wu, Y.T., Prina, A.M., Winblad, B., Jönsson, L., Liu, Z., and Prince, M. (2017). The worldwide costs of dementia 2015 and comparisons with 2010. *Alzheimers Dement* 13, 1-7.
- Winner, B., Lie, D.C., Rockenstein, E., Aigner, R., Aigner, L., Masliah, E., Kuhn, H.G., and Winkler, J. (2004). Human wild-type alpha-synuclein impairs neurogenesis. *J Neuropathol Exp Neurol* 63, 1155-1166.
- Winner, B., Regensburger, M., Schreglmann, S., Boyer, L., Prots, I., Rockenstein, E., Mante, M., Zhao, C., Winkler, J., Masliah, E., *et al.* (2012). Role of α -synuclein in adult neurogenesis and neuronal maturation in the dentate gyrus. *J Neurosci* 32, 16906-16916.
- Witke, F., Ceanga, M., Rudolph, M., Niv, F., Witte, O.W., Redecker, C., Kunze, A., and Keiner, S. (2017). Adult hippocampal neurogenesis poststroke: More new granule cells but aberrant morphology and impaired spatial memory. *PLoS One* 12, e0183463.
- Yasuda, M., Johnson-Venkatesh, E.M., Zhang, H., Parent, J.M., Sutton, M.A., and Umemori, H. (2011). Multiple forms of activity-dependent competition refine hippocampal circuits in vivo. *Neuron* 70, 1128-1142.
- Zhang, R., Zhang, Z., Wang, L., Wang, Y., Gousev, A., Zhang, L., Ho, K.L., Morshead, C., and Chopp, M. (2004a). Activated neural stem cells contribute to stroke-induced neurogenesis and neuroblast migration toward the infarct boundary in adult rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 24, 441-448.
- Zhang, R., Zhang, Z., Zhang, C., Zhang, L., Robin, A., Wang, Y., Lu, M., and Chopp, M. (2004b). Stroke transiently increases subventricular zone cell division from asymmetric to symmetric and increases neuronal differentiation in the adult rat. *J Neurosci* 24, 5810-5815.
- Zhao, C., Deng, W., and Gage, F.H. (2008). Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell* 132, 645-660.

- Zhao, C., Teng, E.M., Summers, R.G., Ming, G.L., and Gage, F.H. (2006). Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus. *J Neurosci* 26, 3-11.
- Zhou, X., Li, Y., Shi, X., and Ma, C. (2016). An overview on therapeutics attenuating amyloid β level in Alzheimer's disease: targeting neurotransmission, inflammation, oxidative stress and enhanced cholesterol levels. *Am J Transl Res* 8, 246-269.
- Zober, A., Ott, M.G., and Messerer, P. (1994). Morbidity follow up study of BASF employees exposed to 2,3,7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) after a 1953 chemical reactor incident. *Occup Environ Med* 51, 479-486.

